CITRAT-LYASE von Streptococcus diacetilactis.

Eigenschaften, Quartärstruktur und Aktivierung durch ein acetylierendes Enzym

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt
von
ANGELA KÜMMEL
aus Göttingen

Göttingen 1976

CITRAT-LYASE von Streptococcus diacetilactis.

Eigenschaften, Quartärstruktur und Aktivierung durch ein acetylierendes Enzym

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

UNIV. LIBRARY BIBL.

vorgelegt
von
ANGELA KÜMMEL
aus Göttingen

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München durchgeführt und durch ein Doktorandenstipendium gefördert.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk
Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 5.November 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534923_0016

οὔτοι ἀπ' ἀρχῆς πάντα θεοὶ θνητοῖσ' ὑπέδειξαν,
ἀλλὰ χρόνῳ ζητοῦντες ἐφευρίσκουσιν ἄμεινον.

καὶ τὸ μὲν οὖν σαφὲς οὔτις ἀνὴρ ἴδεν οὐδέ τις ἔσται
εἰδὼς ἀμφὶ θεῶν τε καὶ ἅσσα λέγω περὶ πάντων·
εἰ γὰρ καὶ τὰ μάλιστα τύχοι τετελεσμένον εἰπών,
αὐτὸς ὅμως οὐκ οἶδε· δόκος δ' ἐπὶ πᾶσι τέτυκται.

Wahrlich nicht von Anfang an haben die Götter den Sterblichen alles enthüllt, sondern allmählich finden sie suchend das Bessere.

Und das Genaue freilich erblickte kein Mensch, und es wird auch nie jemand sein, der es weiß in bezug auf die Götter und alle Dinge, die ich nur immer erwähne; denn selbst wenn es einem im höchsten Maße gelänge, ein Vollendetes auszusprechen, so hat er selbst trotzdem kein Wissen davon; Schein-(meinen) haftet an allem.

XENOPHANES

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	5
1. Organismen	5
2. Kulturmedium	5
3. Anzucht der Zellen	5
4. Wachstumskontrolle und Ernte	6
5. Durchführung der Wachstumsversuche	7
6. Herstellung zellfreier Extrakte	8
7. Proteinbestimmungen	9
8. Konzentrierung von Proteinlösungen	10
9. Dialyse von Proteinlösungen	11
10. Bestimmung von Enzymaktivitäten	11
11. Synthese von Acetyl-Derivaten	14
12. Anreicherung der Citrat-Lyase und ihres acetylierenden Enzyms	14
13. Inaktivierung der Citrat-Lyase	19
14. Reaktivierung der inaktiven Citrat-Lyase	20
15. Elektrophorese	21
16. Molekulargewichtsbestimmung	28
17. Elektronenmikroskopie	28
18. Dissoziationsversuche mit Harnstoff	30
19. Reaggregation der durch Harnstoff zerlegten Enzymmoleküle	30
20. Chemikalien und Enzyme	31
EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	32
I. Nachweis der induktiven Bildung der Citrat-Lyase von *Streptococcus diacetilactis*	32
1.1. Wachstumsphysiologische Versuche	32
1.1.1. Wachstum mit Citrat	32
1.1.2. Wachstum ohne Citrat	37

Seite

II. Anreicherung und Charakterisierung der Citrat-Lyase 39

2.1. Anreicherung 39

2.1.1. Versuche mit zellfreiem Extrakt 39

2.1.2. Stabilität der Citrat-Lyase in verschiedenen Puffersystemen 39

2.1.3. Durchführung der Anreicherung 41

2.1.4. Nachweis von oxidierter und reduzierter Citrat-Lyase im angereicherten Enzympräparat 49

2.2. Prüfung des Reinheitsgrades der angereicherten Citrat-Lyase mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese 49

2.2.1. Analytische Disk-Elektrophorese 49

2.3. Bestimmung des Molekulargewichtes der Citrat-Lyase und ihrer Untereinheiten 57

2.3.1. Analytische Ultrazentrifugation 57

2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese zur Bestimmung von Anzahl und Molekulargewicht der Untereinheiten 61

2.4. Kinetische Untersuchungen 66

2.4.1. Metallionenbedürfnis, pH-Optimum 66

2.4.2. Reaktionsinaktivierung 66

2.4.3. Bestimmung des K_m-Wertes für Citrat 74

III. Nachweis und Anreicherung eines acetylierenden Enzyms der Citrat-Lyase 82

3.1. Herstellung von desacetylierter Citrat-Lyase 82

3.1.1. Eingesetzte Puffersysteme und Stabilitätsprüfung der inaktiven Citrat-Lyase 83

3.1.2. Inaktivierungsdauer in Abhängigkeit von DTE-Konzentration, Reinheitsgrad und Alter der Citrat-Lyase 85

Seite

3.2. Chemische Acetylierung 85
3.3. Enzymatische Reaktivierung desacetylierter Citrat-Lyase 88
3.3.1. Acetyl-CoA-abhängige Reaktivierung 88
3.3.2. ATP- und Acetat-abhängige Reaktivierung 90
3.4. Versuch zur Anreicherung des acetylierenden Enzyms 92
3.5. Studium der enzymatischen Reaktivierung unter verschiedenen Bedingungen 95
3.5.1. Reaktivierung in Abhängigkeit von Ionenkonzentration, DTE-Konzentration und Temperatur 95
3.5.2. Reaktivierung in Abhängigkeit von eingesetzter inaktiver Citrat-Lyase-Konzentration 99
3.5.3. Vergleich der Reaktivierung mit ATP, GTP, UTP und Acetyladenylat 102
3.5.4. Reaktivierung nach Inkubation mit Harnstoff und nach Inaktivierung aktiver Citrat-Lyase mit Hydroxylamin 106
3.6. Nachweis der Substratspezifität des acetylierenden Enzyms von *Streptococcus diacetilactis* 106
3.7. Inkubation aktiver Citrat-Lyase mit ATP und Acetat oder Acetyl-Imidazol nach Behandlung mit DTE 109
3.8. Orientierender Versuch zur Klärung des Reaktivierungsmechanismus 111

IV. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Quartärstruktur der Citrat-Lyase von *Streptococcus diacetilactis* 117
4.1. Nachweis von drei Formen für die Citrat-Lyase 117

Seite

4.2. Versuche zum Nachweis der Funktion und der Beziehung der drei Formen zueinander 126

4.2.1. Elektronenmikroskopie von aktivem und inaktivem Enzym 126

4.2.2. Dissoziation und Reaggregation von Enzymmolekülen der Citrat-Lyase 126

4.2.3. Versuch der Trennung der drei Formen durch Ionenaustauschchromatographie 132

4.2.4. Änderung der Verhältnisses der im Gleichgewicht stehenden Ring- und Sternform durch

a) Inkubation der Citrat-Lyase mit ihrem Substrat Citrat 135

b) Inkubation mit Citratanalogen 138

DISKUSSION 144

Der Multienzymkomplex:Citrat-Lyase

I. Interpretation seiner Aktivitäten 144

II. Strukturanalyse des Multienzymkomplexes 152

III. Kinetisches Verhalten des Multienzymkomplexes 161

ZUSAMMENFASSUNG 169

LITERATURVERZEICHNIS 173

ABKÜRZUNGEN

ACP	Acyl-Carrier-Protein
AK	Acetatkinase
AS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
CL	Citrat-Lyase
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid
DEAE-	Diäthylaminoätyhl-
DTE	Dithioerytrit
DTT	Dithiothreitol
E	Enzymeinheit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion (reduziert)
KPO_4	Gemisch von KH_2PO_4 und K_2HPO_4
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
MET	2-Mercaptoäthanol
MG	Molekulargewicht
MK	Myokinase
NAD(H_2)	Nicotinamid-adenin-denucleotid (reduziert)
OAA	Oxalacetat
P_i	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PTA	Phosphotransacetylase
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triäthanolamin(hydrochlorid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

EINLEITUNG

Citrat ist ein normaler Bestandteil jeder lebenden Zelle. Ungeklärt ist, warum der Citratanteil in bestimmten Geweben, wie z. B. in Citrusfrüchten, Knochen, Drüsen besonders hoch ist oder warum gewisse Schimmelpilze Glucose quantitativ zu Citrat vergären.
Welche Schlüsselposition jedoch die Citronensäure im Intermediärstoffwechsel einnimmt, wurde durch die Aufklärung des Tricarbonsäure-Cyclus durch KREBS und JOHNSON (1937) bekannt. Als zentraler Metabolit stellt die Citronensäure im Stoffwechsel Reduktionsäquivalente sowie C_2-Körper für Biosynthesen bereit und dient als Kontrollorgan für eine Reihe von Enzymen, wie z. B. als negativer Effektor für die Phosphofructokinase (PARMEGGIANI und BOWMAN, 1963) oder als positiver Effektor für die Acetyl-CoA-Carboxylase (MARTIN et al., 1962).

Natürlich ist zum Verständnis des Citratstoffwechsels das Wissen über die Enzyme, die diese Verbindung umsetzen, notwendig. Allein drei Enzyme sind bekannt, die die Spaltung von Citrat zu einem C_2- und einem C_4-Körper katalysieren:

1. Citrat-Lyase

$$\text{Citrat}^{3-} \xleftrightarrows{Mg^{2+}} \text{Acetat}^{-} + \text{Oxalacetat}^{2-}$$

2. Citrat-Synthase

$$\text{Citrat}^{3-} + \text{CoA} + H^{+} \rightleftharpoons \text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat}^{2-} + H_2O$$

3. ATP-Citrat-Lyase

$$\text{Citrat}^{3-} + \text{CoA} + \text{ATP}^{4-} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat}^{2-} + \text{ADP}^{3-} + \text{Pi}^{2-}$$

Bei der von diesen Enzymen katalysierten Aldolreaktion erfolgt eine reversible Bildung einer C-H-Bindung aus einer C-C-Bindung.
Während die Citrat-Lyase für den anaeroben Citratabbau ausschließlich in Bakterien verantwortlich ist, kommt die Citrat-Synthase in allen Zellen vor, wobei das Gleichgewicht der Reaktion vollkommen auf der Seite der Citrat-Bildung liegt. Das ATP-bedürftige "Citrate Cleavage Enzyme" ist nur im tierischen Stoffwechsel vertreten.

Citrat-Lyase katalysiert die einfachste Reaktion unter den genannten Enzymen. DAGLEY und DAWES (1953a) beschrieben die Funktion der Citrat-Lyase im Bakterienstoffwechsel als einen Teil eines "Citratvergärenden Stoffwechselweges". Aufgrund von Gärungsanalysen bei acetoinbildenden *Streptococcus*- und *Leuconostocarten* postulierten VAN BEYNUM und PETTE (1939), daß die erste Reaktion im anaeroben Abbau des Citrats eine Spaltung zu Oxalacetat und Acetat sei. Zu dem gleichen Ergebnis gelangten BREWER und WERKMAN (1939) und DEFFNER und FRANKE (1939) bei Versuchen mit *Aerobacter aerogenes* und CAMPELL und GUNSALUS (1944) mit *Streptococcus faecalis*. Nachfolgende Studien mit zellfreien Extrakten und teilweise gereinigten Enzympräparaten von *A. aerogenes* (DAGLEY und DAWES, 1953a, b; 1955), *Escherichia coli* (DAGLEY und DAWES, 1955; WHEAT und AJL, 1955a, b; GRUNBERG-MANAGO und GUNSALUS, 1953), *S. faecalis* (GILLESPIE und GUNSALUS, 1953; DAGLEY und DAWES, 1955) und *Rhodopseudomonas gelatinosa* (GIFFHORN, BEUSCHER und GOTTSCHALK, 1972) zeigten, daß die reversible Spaltung durch ein induzierbares Enzymsystem erfolgt. Die Lyase entfaltet katalytische Aktivität erst in Gegenwart von zweiwertigen Metallionen, insbesondere von Mg^{++} oder Mn^{++}. Ca^{++} fungiert als kompetitiver Inhibitor gegenüber anderen Metallionen. CoA wird als Co-Faktor nicht benötigt.

BUCKEL, BUSCHMEIER und EGGERER (1971) studierten den Wirkungsmechanismus dieses katabolischen Enzyms in *Klebsiella aerogenes*.

Ihre Forschungen ließen erkennen, daß native Citrat-Lyase ein Acetyl-Enzym darstellt. Die Acetylgruppe ist kovalent als Thioester am Protein gebunden und stellt die funktionelle Gruppe des Enzyms dar. Nach Untersuchungen von SRERE et al. (1972) und BUCKEL et al. (1972) ist der Acetylrest an ein Phosphopantothein gebunden, das als prosthetische Gruppe des Acyl-Carrier-Proteins der CL fungiert. Die Gesamtreaktion läuft in zwei Teilschritten ab, einem Acylaustausch und einer Acyl-Lyase-Reaktion (BUCKEL et al., 1971):

$$\text{Acetyl-S-CL} + \text{Citrat} \xrightarrow{\text{Acyl-Transferase}} \text{Citryl-S-CL} + \text{Acetat} \quad (2)$$

$$\text{Citryl-S-CL} \xrightarrow{\text{Lyase}} \text{Acetyl-S-CL} + \text{Oxalacetat} \quad (3)$$

$$\text{Citrat} \longrightarrow \text{Oxalacetat} + \text{Acetat} \quad (1)$$

Durch die erste Teilreaktion entsteht aus dem S-Acetyl-Enzym ein S-Citryl-Enzym. Diese Reaktion kann als Aktivierung des Substrates auf dem "Enzymniveau" aufgefaßt werden. In der zweiten Teilreaktion führt die Spaltung von S-Citryl-Enzym zu Oxalacetat und dem regenerierten Acetyl-S-Enzym.

Ein interessanter Aspekt liegt im relativ instabilen Verhalten der Citrat-Lyase unter verschiedenen Bedingungen. So wird die Citrat-Lyase aus *A. aerogenes* während der Reaktion rasch inaktiviert. Diese Reaktionsinaktivierung wurde von SINGH und SRERE (1971) eingehend untersucht, jedoch erst von BUCKEL et al. (1971) aufgeklärt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Desacetylierung. In vitro kann das Enzym durch chemische Acetylierung mit Essigsäureanhydrid wieder aktiviert werden.

Da die Citrat-Lyase in einer aktiven (S-Acetyl-Protein) und einer inaktiven (SH-Protein) Form vorkommen kann, besteht die Möglichkeit, daß sie durch Modifikation in Bakterien reguliert werden kann. Hinweise für einen solchen Regulationsmechanismus wurden für *K. aerogenes* (KULLA, 1973) erhalten; für das phototrophe Bakterium *R. gelatinosa* konnte eine Regulation durch kovalente Modifikation nachgewiesen werden (GIFFHORN und GOTTSCHALK, 1975a, b).

Während die Citrat-Lyase bei *R. gelatinosa* in erster Linie die Aufgabe hat, Oxalacetat als Ausgangsmaterial für Biosynthesen zu liefern, liegt bei den heterotrophen Milchsäure- und Enterobakterien die Priorität auf der Energiegewinnung durch Vergären des Substrates.
Bei den Enterobakterien und bei *R. gelatinosa* war ein induzierbares Enzymsystem zur Spaltung des Citrat nachgewiesen worden. Eine konstitutiv gebildete Citrat-Lyase konnte nur bei dem Milchsäurebakterium *S. diacetilactis* festgestellt werden (HARVEY und COLLINS, 1961), während das Enzym bei anderen citratvergärenden Lactobakterien ebenfalls induktiv gebildet wurde (KÜMMEL, 1973).

Die Ergebnisse von Vorversuchen hatten gezeigt, daß die Citrat-Lyasen von Milchsäurebakterien keiner Reaktionsinaktivierung unterlagen und daß diese Enzyme in vivo in der Abwesenheit von Citrat aktiv blieben.

Die angedeuteten Unterschiede in den Eigenschaften und dem Verhalten der Citrat-Lyase der Lactobakterien einerseits und den Enterobakterien und *R. gelatinosa* andererseits bedurften einer eingehenden Untersuchung und versprachen einen interessanten Vergleich. So sollte zum Beispiel geklärt werden, ob Molekülgröße und Aufbau aus Untereinheiten des Enzyms bei den verschiedenen Bakterientypen übereinstimmten. Neben der Verwendung biochemischer Methoden zur Aufklärung der Struktur sollten auch elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Dissoziations- und Reaggregationsversuche sollten folgen.

Ein weiterer Aufgabenbereich lag in der Klärung der Frage nach dem acetylierenden Enzymsystem in *S. diacetilactis*.
Unter der Annahme, daß de novo ein HS-Enzym gebildet wurde, das durch ein acetylierendes Enzym in das aktive Acetyl-S-Enzym umgewandelt wurde, sollte eine solche enzymatische Aktivität nachgewiesen, isoliert und charakterisiert werden können.

MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchungen wurden mit *Streptococcus diacetilactis* DRC 1 und *Leuconostoc citrovorum* ATCC 8082 durchgeführt.

2. Kulturmedium

Zusammensetzung der Nährlösung nach (HARVEY und COLLINS, 1961):

Lactose	20,0 g
Bacto-Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	15,0 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2 g
Na-Acetat	2,0 g
Na-Citrat x 2 H_2O	1,5 g anstelle von 0,5 g
mit aqua bidest ad	1 Liter
pH 6,8	

Je nach den Versuchsbedingungen erfolgte das Ansetzen der Nährlösung mit oder ohne Citrat. Das Medium wurde zu zwei Dritteln in Meßkolben oder Steilbrustflaschen gefüllt und bei 120° C autoklaviert; die Dauer war abhängig von den Volumina der zu sterilisierenden Medien.

3. Anzucht der Zellen

Da die Stämme von *S. diacetilactis* und *L. citrovorum* als Trokkenkulturen aufbewahrt wurden, mußten sie zuerst in 10 ml Medium 8-12 Stunden lang inkubiert werden. Stufenweises Überimpfen auf 100 ml-Meßkolben, 1000 ml-Meßkolben und 10 l-Steilbrustflaschen erfolgte mit 1/10 der jeweiligen Vorkultur. Die

Brutraumtemperatur schwankte zwischen 28° C und 30° C. Mikroskopische Kontrollen zur Reinheitsprüfung wurden durchgeführt. Flüssigkeitskulturen, die als Impfgut verwendet werden sollten, mußten alle vier Wochen in frisches Medium überimpft werden.

Für die Massenanzucht wurde ein 380 l-Fermenter der AG für Biologische Verfahrenstechnik (Basel) verwendet. Die Nährlösungskomponenten für 300 l wurden in fester Form in den Fermenter gegeben und hitzesterilisiert.
Mit Beginn der logarithmischen Phase wurde mittels eines Kontaktors (Umwälzsystem, Rührgeschwindigkeit 700 rpm) gerührt. 2-3 ml Silicon der Firma Bayer wurden zugefügt, um das Schäumen zu verhindern. Der anfängliche pH von 6,6 lag bei der Ernte bei 5,9.

4. Wachstumskontrolle und Ernte

Das Wachstum der Kulturen wurde anhand von Trübungsmessungen im Zeiss PL 4 Photometer verfolgt (Glasküvetten d = 1 cm, λ = 660 nm).

Zu Beginn der stationären Phase bei Extinktionswerten von 3,1 wurden die Zellen geerntet. Massenkulturen in 10 l-Steilbrustflaschen wurden unter Kühlung mittels einer Durchlaufzentrifuge (CEPA, Firma C. Padberg, Lahr/Baden) bei 36 000 upm sedimentiert.

Die Bakteriensuspension der Fermenteranzucht wurde zunächst durch einen Separator konzentriert (Westfalia Separator Typ SAOOH 205, Firma Westfalia Separator AG, Oelde/Westf.). Das Konzentrat wurde in einer Christ Zeta 20 Zentrifuge (Firma Heraeus-Christ GmbH, Osterode/Harz) bei 8 000 xg und 4° C 20 min lang sedimentiert. Die Ausbeute der Fermenteranzucht von *S. diacetilactis* lag bei 2,1 kg Naßgewicht, was einer Ausbeute von 7 g Naßgewicht/1 NL entsprach.

Die Zellmasse wurde jeweils zweimal mit 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 6,2, + 0,2 M KCL + 3 mM $MgSO_4$ bei 4° C gewaschen und bis zum Gebrauch bei -20° C eingefroren.

5. Durchführung der Wachstumsversuche

Bei den Wachstumsversuchen in 10 l-Steilbrustflaschen wurden mit Stickstoff Proben aus dem Kulturgefäß gedrückt. Der Stickstoff durchströmte vor dem Eindringen in die Kulturgefäße eine Waschflasche mit alkalischer Pyrogallollösung. Vor jeder Probenentnahme wurden die abgesetzten Zellen mit einem Magnetrührer im Medium gleichmäßig verteilt. Es wurden jeweils 900 ml Probe entnommen und sofort auf 100 g gestoßenes Eis aus aqua bidest gegeben und abzentrifugiert (ZETA-Christ-Zentrifuge; Rotor: 6 x 500; 15 min bei 10 000 U/min). Zuvor waren Trübung und pH bestimmt worden. Der Überstand der Zentrifugation wurde zur Citratbestimmung bei -20° C eingefroren. Das gewaschene Pellet wurde für die Enzymtests bei derselben Temperatur aufbewahrt.

Bei Prüfung der Frage nach der Konstitutivität der Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* waren die Zellen in 1 l Medium mit Citrat im Meßkolben gewachsen. Am Ende der logarithmischen Phase wurden 50 ml der Kultur in sterilen Schraubdeckelröhrchen abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 4 000 U/min), in Medium ohne Citrat suspendiert und 1 l-Kulturen ohne Citrat beimpft. Der Rest wurde abzentrifugiert und die CL-Aktivität bestimmt. Von den gewachsenen Kulturen (-Citrat) wurde direkt weitergeimpft, der Rest jeweils zur CL-Bestimmung verwendet. Nach mehrmaligem Überimpfen in Kulturen ohne Citrat wurden zuletzt wieder Kulturen mit Citrat beimpft.

6. Herstellung zellfreier Extrakte

Ultraschallbehandlung

50 g eingefrorene oder frische Zellen wurden in 140 ml 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 6,2 + 0,2 M KCL + 3 mM $MgSO_4$ suspendiert und wegen des Schleimgehaltes der Zellmasse mit Hilfe des "Ultra-Turrax" (Firma Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau) homogenisiert. Die Suspension wurde mit 5 g Aluminiumoxid versetzt und Aliquots von 20 ml wurden in Intervallen von 2 min insgesamt 7 min mit dem Ultraschall-Desintegrator (Firma Schoeller & Co., Frankfurt am Main; 20 kHz, 600 W) aufgeschlossen. Eine Temperatur von max. 8° C wurde durch Kühlung mittels eines Kryomaten (Ultra-Kryomat TK-30 D; Meßgeräte-Werk Lauda) nicht überschritten. Die Zellrückstände wurden 20 min bei 15 000 U/min abzentrifugiert (ZETA-Christ-Kühlzentrifuge; 5° C). Der Überstand wurde abgehebert und die CL-Aktivität sofort bestimmt.

Die optimale Beschallzeit wurde ermittelt, indem 4 g Zellen in 20 ml Puffer aufgenommen, mit 0,4 g Aluminiumoxid versetzt und unterschiedlich lange beschallt wurden.

Tab. 1: Einfluß der Beschalldauer auf die Gesamtaktivität und die spezifische Aktivität der Citrat-Lyase in Zellextrakten

Beschallungszeit (min)	Proteingehalt (mg Pr/ml)	Gesamtaktivität (E/ml)	spez. Aktivität (E/mg Pr)
3	10,7	59,1	5,52
5	11,5	69,2	6,01
7	13,0	80,0	6,2
10	14,2	87,6	6,15
12	15,0	91,5	6,08

Testansatz und Proteinbestimmung wie unter Punkt 10 und 7 angegeben.

7. Proteinbestimmungen

Vor der quantitativen Bestimmung wurde das Protein ausgefällt. Die Proteinlösung wurde mit H_2O auf ein Volumen von 1 ml gebracht und nach Zugabe von 0,2 ml einer 20%igen Trichloressigsäurelösung gemischt und 20 min bei 4 000 U/min abzentrifugiert (Laborzentrifuge Universal Junior II, Firma M. Christ, Osterode/Harz).

a. Methode modifiziert nach LOWRY et al. (1951)

Reagenz I	25 ml	3% Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH
	0,5 ml	2% KNa-Tartrat
	0,5 ml	1% $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$

Das Reagenz I wurde kurz vor Gebrauch aus den Stammlösungen hergestellt.

Reagenz II Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Firma Merck, Art. Nr. 9001) 1 : 1 mit H_2O eingesetzt.

Das Proteinpräzipitat (s. o.) wurde in 0,5 ml H_2O aufgenommen, mit 2,5 ml Reagenz I und 0,25 ml Reagenz II versetzt. Nach 20 min erfolgte die Messung der Extinktion bei 750 nm in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke an einem Zeiss-Photometer PM 4. Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin (0,3 mg RSA/ml) als Proteinstandard (15-120 µg/ml) ermittelt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Formel:

$$E_{750} \cdot \text{Faktor} = \text{mg Protein/ml Extrakt}$$

b. Methode nach HARTREE (1972)

Modifikation der LOWRY-Methode, die eine Linearität zwischen Proteingehalt und Extinktion aufweist.

Lösung A — 2 g KNa-Tartrat + 100 g Na_2CO_3 lösen in 500 ml 1 N NaOH, mit aqua dest. auf 1 000 ml auffüllen.

Lösung B — 2 g KNa-Tartrat + 1 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ lösen in 90 ml aqua dest., 10 ml 1 N NaOH zugeben.

Lösung C — 1 Vol. Folin-Reagenz mit 15 Vol. aqua dest. verdünnen (täglich frisch ansetzen).

Testansatz: 1 ml Proteinlösung + 0,9 ml Lösung A werden 10 min bei 50° C inkubiert. Nach Abkühlen erfolgt die Zugabe von 0,1 ml Lösung B; 10 min bei Raumtemperatur stehenlassen. Danach schnelle Zugabe von 3 ml Lösung C; Inkubation bei 50° C für 10 min.

Die Extinktionsmessung erfolgt bei 650 nm in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke gegen einen Nullwert.

c. Methode nach WARBURG und CHRISTIAN (1942)

Mit einem Zeiss-Spektralphotometer PM 4 wurde die Extinktion gereinigter Proteinlösungen bei 260 und 280 nm gegen einen Nullwert gemessen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe dieser Meßwerte aus einer Tabelle ermittelt (Nomograph von E. Adams Calif. Corp. for Biochemical Research, California).

8. Konzentrierung von Proteinlösungen

Konzentrierungsschritte wurden in Ultrafiltrationszellen und mit Membranen der Firma Amicon (Oosterhout, Holland) durchgeführt.

Ultrafiltrationsgeräte:	UF Zelle	12	(bis 10 ml)
	UF Zelle	52	(bis 65 ml)
	UF Zelle	202	(bis 200 ml)

Für größere Volumina (bis 600 ml) wurde das Hochleistungs-UF System TCF verwendet. Das Ende der Filtration wurde mit dem Endpunkt-Überwachungsgerät EC 20 kontrolliert. Alle Filtrationen wurden mit Stickstoffdruck bei 4° C unter Berücksichtigung des vom Kammertyp abhängigen Drucks durchgeführt. Es wurden Membranen der PM- und der XM-Serien eingesetzt mit definierten Durchlaßgrenzen von 10 000 - 300 000 Dalton.

Für geringe Volumina (bis 3 ml) wurden Miniconzellen A 25 verwendet, deren Durchlaßgrenze bei 25 000 Dalton liegt.

9. Dialyse von Proteinlösungen

Kleine Volumina wurden mit der oben angeführten Miniconzelle A 25 dialysiert, während für größere Proteinmengen Dialysierschläuche der Firma Union Carbide Corporation (Chicago) verwendet wurden. Die Dialyse erfolgte bei 4° C mit mehrmaligem Pufferwechsel unter langsamer magnetischer Rührung. Vor Gebrauch wurde der Dialysierschlauch 10 min mit EDTA ausgekocht und anschließend in aqua bidest aufbewahrt. Teilweise wurde der Dialysierschlauch mit 0,1%iger RSA-Lösung behandelt.

10. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität wurde für jedes Enzym in dem Bereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Proteinmenge ermittelt und in Einheiten (E) pro mg Protein angegeben. 1 E ist als Umsatz von 1 µMol Substrat pro Minute definiert.

Alle Messungen wurden mit einem Zeiss PM 4 Spektralphotometer

durchgeführt. Das Photometer war über einen TE-Wandler (Firma Carl Zeiss) mit einem Kompensationsschreiber (Servogor) gekoppelt, welcher die Extinktionsänderung während der Reaktion aufzeichnete. Der Küvettenblock des Photometers war an ein Thermostatenbad angeschlossen, welches die Temperatur konstant bei 25° C hielt. Die Standardtests wurden in 1 oder 3 ml Küvetten bei 1 cm Schichtdicke durchgeführt.

a. Citratbestimmung nach MOELLERING und GRUBER (1966)

0,5	M	Tris/HCl-Puffer pH 7,4	0,1 ml
0,1	M	K-Citrat	0,05 ml
0,1	M	$MgCl_2$	0,02 ml
0,01	M	NADH, Na-Salz	0,03 ml
1	mg/ml	Malat-Dehydrogenase	0,01 ml
1,1	mg/ml	Citrat-Lyase	0,05 ml
		mit H_2O ad 1 ml	

Die verwendete Citrat-Lyase war ein lyophilisiertes Präparat der Firma Boehringer, Mannheim, mit einer spezifischen Aktivität von 8 U/mg Protein. Meßstrahlung: 365 nm.

b. Bestimmung von Coenzym A nach ELLMANN (1959)

0,98 ml	0,05 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2 enthaltend 3,9 mg DTNB pro 100 ml
0,02 ml	Coenzym-A-Lösung

1 µMol freies CoA ergibt bei 412 nm eine Extinktionsänderung von 13,6.

c. Bestimmung der Citrat-Lyase nach DAGLEY (1969) modifiziert nach KÜMMEL (1973)

0,5	M	KPO_4-Puffer, pH 7,2	0,1 ml
0,1	M	K-Citrat	0,05 ml
0,1	M	$MgCl_2$	0,02 ml
0,01	M	NADH, Na-Salz	0,03 ml
1	mg/ml	MDH	0,01 ml
		Enzymlösung (0,05 E)	0,01 ml
		H_2O ad 1 ml	

Meßstrahlung: 365 nm

Für Reaktionsinaktivierungsmessungen der Citrat-Lyase wurde 0,5 M Tris/Acetat-Puffer, pH 7,2 verwendet anstelle von KPO_4-Puffer. Um auszuschließen, daß sich ATP im Testansatz befand, wurden 0,01 ml einer 1 M Glucose-Lösung und 0,01 ml einer Hexokinase-Lösung (10 mg/ml) zugefügt.

d. Bestimmung der Phosphotransacetylase nach BERGMEYER (1970)

0,1	M	TRIS/HCl-Puffer, pH 7,2	2,6 ml
30	mg/ml	GSH	0,05 ml
5	mg/ml	CoA	0,2 ml
40	mg/ml	Acetylphosphat	0,1 ml
1	M	Ammoniumsulfat	0,03 ml
		Enzymlösung	0,02 ml

Meßstrahlung: 233 nm

e. Bestimmung der Acetat-Kinase nach BERGMEYER (1970)

0,1	M	TEA-Puffer, pH 7,6	2,01 ml
2,0	M	Acetat, Na-Salz	0,5 ml
50	mg/ml	ATP, Na-Salz	0,2 ml
15	mg/ml	PEP, CHA-Salz	0,1 ml

10	mg/ml	NADH, Na-Salz	0,08 ml
0,1	M	$MgCl_2$	0,04 ml
2	mg/ml	PK	0,02 ml
2	mg/ml	LDH	0,02 ml
2	mg/ml	MK	0,02 ml
		Enzymlösung	0,01 ml

Meßstrahlung: 365 nm

11. Synthese von Acetyl-Derivaten

a. Synthese von Acetyl-CoA nach SIMON und SHEMIN (1953)

10 mg HS-Coenzym A wurden in 1 ml H_2O bidest gelöst und mit 0,1 ml 1 M $KHCO_3$-Lösung versetzt. Zu 10 ml eiskaltem H_2O bidest wurden 0,2 ml Essigsäureanhydrid pipettiert und von dieser Lösung schnell 0,2 ml zur SH-CoA-Lösung gegeben. Nach ca. 10-45 min war die Acetyl-Coenzym A-Bildung beendet.

b. Synthese von Acetyladenylat nach JENCKS (1963)

Acetyladenylat-Lösung wurde von F. GIFFHORN zur Verfügung gestellt. Acetyladenylat war nach JENCKS (1963) aus Acetanhydrid und AMP synthetisiert und nach BERG (1962) mit dem Hydroxamsäuretest gemessen worden. Diese Präparate wurden ohne weitere Reinigung für die enzymatische Reaktivierung der Desacetyl-Citrat-Lyase eingesetzt.

12. Anreicherung der Citrat-Lyase und ihres acetylierenden Enzyms

Alle Anreicherungsschritte wurden bei 0-4° C durchgeführt. Wie unter EXPERIMENTE und ERGEBNISSE angegeben, erwies es

sich als ungünstig, geerntete Zellen über mehrere Monate bei -20° C aufzubewahren. Die letzten Anreicherungen wurden deshalb mit frisch geernteten Zellen durchgeführt. Pro Anreicherung wurden durchschnittlich 55 g Zellen verwendet und der Rohextrakt wie unter Punkt 6 angegeben hergestellt.

Die Fällungen erfolgten unter langsamem Rühren mit einem Magnetrührer in einem hohen Becherglas im Eisbad. Die 2%ige CTAB-Lösung wurde kurz vor Gebrauch bei Zimmertemperatur angesetzt. Das kristalline Ammoniumsulfat wurde mit einem Mörser pulverisiert und langsam mit einem Spatel zum Extrakt gegeben.

Entsalzt wurden die Fraktionen mit Hilfe einer Sephadex G-25-Säule (1,5 x 30 cm). Sephadex G-25 mußte vor Gebrauch über Nacht eingeweicht werden und wurde mit 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 6,2 + 200 mM KCl + 3 mM $MgCl_2$ äquilibriert. Für die Anreicherung wurden weiterhin Säulen mit Sepharose 6-B (2,5 x 90 cm) und mit dem Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A-50 (0,9 x 15 cm) eingesetzt. Sepharose 6-B wurde in Gelform aus dem Handel bezogen, in Puffer äquilibriert und die Säule gegossen, die mehrmals verwendet werden konnte. DEAE-Sephadex A-50 mußte über Nacht eingeweicht werden. Die Säule wurde jeweils kurz vor Gebrauch fertiggestellt und konnte nur einmal benutzt werden. Vor dem Füllen der Säule wurde das Material in einer Absaugflasche mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entlüftet. Das Material wurde mit dem für den Versuch entsprechenden Puffer äquilibriert. Der lineare Puffergradient für die Sephadex A-50-Säule wurde in zwei mit Siliconschläuchen verbundenen 200 ml Niveauflaschen hergestellt.

Die Fraktionen von 4 oder 0,8 ml Volumen wurden in einem Fraktionssammler aufgefangen (LKB-PRODUCTOR, AB, BROMMA 1, Schweden). Der Proteingehalt der Fraktionen wurde nach der Methode von WARBURG und CHRISTIAN (1942) bei 280 nm bestimmt.

a. Fällung der Nucleinsäuren

Um das optimale Fällungsmittel zu finden, wurde nacheinander mit unterschiedlichen Konzentrationen an Protaminsulfat, Streptomycinsulfat und CTAB gearbeitet. Die 2%ige CTAB-Lösung wurde jeweils frisch bei Zimmertemperatur angesetzt. Eine Fällung mit CTAB ergab die günstigste Ausbeute.

Die Nucleinsäuren wurden in der Kälte durch tropfenweises Zusetzen einer CTAB-Lösung (0,2 ml/ml Extrakt) zum Rohextrakt (133 ml) ausgefällt. Um eine gleichmäßige Verteilung zu erzielen, wurde während und nach dem Zutropfen zusätzlich 30 min magnetisch gerührt. Der Niederschlag aus Nucleinsäuren und mitgerissenen Proteinen wurde 30 min bei 15 000 xg abzentrifugiert (Zeta 20; Firma Christ).

b. Fällung der Proteine

In den ersten Anreicherungen wurden die Proteine durch steigende Ammoniumsulfatkonzentrationen stufenweise ausgefällt. Die Citrat-Lyase wurde bei einer AS-Konzentration von 60-70% gefällt. Es erwies sich jedoch, daß sich Ammoniumsulfat ungünstig auf die Stabilität des Enzyms auswirkte. Das Fällen der Proteine mit KCl, K_2SO_4, K-acetat, $MgCl_2$ und NaCl scheiterte meist an der zu geringen Löslichkeit der Salze bei 0° C. Na-Ionen hemmten die CL-Aktivität. Eine Fällung mit Äthanol brachte eine zu geringe Ausbeute. Die Pellets wurden in 0,1 M KPO_4-Puffer pH 6,2 + 0,2 M KCl + 3 mM $MgCl_2$ aufgenommen und homogenisiert.

Eine Lösung brachte die Behandlung des CTAB-Überstandes mit Aluminiumgel. Citrat-Lyase wurde nicht gefällt, wohl aber ein großer Teil der anderen Proteine.

c. Fraktionierung mit Aluminiumgel

Der von den Nucleinsäuren befreite klare Extrakt (143 ml) wurde mit 0,625 ml $Al(OH)_3$ C_γ-Gel ("mindestens 3 Monate gealtert"; 20 mg Trockengewicht/ml) pro ml Extrakt unter magnetischem Rühren versetzt. Anschließend wurde 30 min weitergerührt und der Niederschlag bei 15 000 x g in 30 min abgetrennt. Der Überstand wurde auf circa 35 ml durch Ultrafiltration mit PM 10 Membranen von Amicon (N.V.) konzentriert.

d. Sepharose-6 B-Chromatographie

Die erhaltene Proteinlösung wurde mit 15% Saccharose versetzt und auf eine Sepharose 6-B-Säule (2,5 x 90 cm) aufgetragen, die äquilibriert war mit 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 6,2 + 0,2 M KCl + 3 mM $MgCl_2$. Das Protein wurde mit demselben Puffer eluiert; die Citrat-Lyase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf eine zweite Sepharose 6-B-Säule gleichen Ausmaßes gegeben. Fraktionen von 4 ml wurden gesammelt bei einer Durchflußrate von 16 ml/Std.; Fraktionen 41-54 wurden vereinigt und äquilibriert gegen 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,0 + 0,05 oder 0,1 M KCl + 3 mM $MgCl_2$ bei wiederholter Konzentration und Verdünnung in einer Ultrafiltrationskammer mit PM 10 Membranen.

e. DEAE-Sephadex-A 50-Chromatographie

Die Proteinlösung (7,6 ml) wurde auf eine DEAE-Sephadex-A 50-Säule (0,9 x 15 cm; oder 1,5 x 30 cm) aufgetragen, die gegen den gleichen Puffer wie die Enzymlösung äquilibriert war. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 150 oder 100 ml des oben genannten Puffers und von 150 oder 100 ml des oben genannten Puffers mit einer KCl-Konzentration von 0,75 M von der Säule eluiert. Die Fraktionen 85-107 oder im Bereich von 37-60 (0,8 ml; Durchflußrate von 8 ml/Std.) wurden vereinigt und mit

0,1 M KH_2PO_4 + 0,2 M KCl + 3 mM $MgCl_2$, pH 4 auf pH 6,2 eingestellt, auf 5 ml durch Ultrafiltration konzentriert und bei 4^{o} C aufbewahrt. Zur Strukturaufklärung der Citrat-Lyase mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden noch zwei weitere Proteinpeaks vereinigt und zur Reinheitskontrolle eine zweite Chromatographie an DEAE-Sephadex-A 50 unter den gleichen Bedingungen wie beim ersten Säulenlauf durchgeführt.

f. Zusätzliche Behandlung des acetylierenden Enzyms

In orientierenden Versuchen zur Anreicherung des acetylierenden Enzyms, dessen zuerst angenommenes Substrat Acetyl-CoA sein sollte, konnte erst nach dem Sepharose-6B-Säulenlauf eine Separation von der Citrat-Lyase erzielt werden. Wie es sich jedoch später herausstellte, handelte es sich bei der abgetrennten Fraktion nicht um das acetylierende Enzym, sondern um die Anreicherung der Phosphotransacetylase.

Eine Trennung des acetylierenden Enzyms von der Citrat-Lyase konnte innerhalb der Anreicherung nicht erfolgen, da die Acetat: SH-Enzym-Ligase bei *S. diacetilactis* mit der Citrat-Lyase assoziiert war und demzufolge beide Enzyme zusammen angereichert wurden.
Zum Nachweis des acetylierenden Enzyms wurden bei jedem Anreicherungsschritt Aliquots entnommen. Proteinproben vom Rohextrakt, CTAB-Überstand und $AL(OH)_3$-Überstand wurden durch einen G 25 Säulenlauf entsalzt, um eventuell vorhandenes Acetat und ATP abzutrennen, was bei der Inaktivierung und Reaktivierung stören würde. Die Citrat-Lyase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration konzentriert. Proben von allen Anreicherungsschritten wurden nach Punkt 13 b inaktiviert und wie unter Punkt 14 c angegeben reaktiviert.

13. Inaktivierung der Citrat-Lyase

a. Mit Hydroxylamin nach BUCKEL et al. (1971)

Inkubationsansatz: Volumen 1 ml; Temp. 25° C; Meßstrahlung 365 nm

0,5 M	KPO_4-Puffer, pH 7,2	0,1 ml
1,0 M	Hydroxylaminlösung	0,1 ml
	+ 3 E Enzym	

Proben von 20 µl (0,06 E) wurden anfangs in Minutenabständen, später in 5 min Abständen in einen normalen Citrat-Lyase-Test gegeben und die Cl-Aktivität verfolgt. Reaktiviert wurde chemisch und enzymatisch.

b. Mit 1,4-Dithioerythrit

Zur Optimierung der Inaktivierung wurden viele Versuche durchgeführt. Im basischen Bereich ist die Citrat-Lyase labil und am leichtesten angreifbar. Aliquots von 10-20 E Cl wurden mit 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 8 + 0,2 M KCl + 3 mM $MgCl_2$ auf ein Volumen von 1 ml gebracht, so daß der endgültige pH bei 7,8 lag. DTE wurde bis zu einer Endkonzentration von 4 mM hinzugefügt und die Inkubation für 45 min bei 30° C im Wasserbad gestartet. Nachfolgend wurde der pH mit 2 M H_3PO_4 auf 6,4 eingestellt und die Lösung bei 4° C aufbewahrt.
Eine schonendere Methode bestand darin, das Enzym bei pH 6,2 zu belassen, mit DTE bis zur Endkonzentration von 6 mM zu versetzen und im Kühlschrank bei 4° C inaktivieren zu lassen. Nach sieben bis zehn Tagen war das Enzym inaktiv. Nach einem anfänglichen Aktivitätsverlust von 13% war die inaktive Citrat-Lyase über Monate stabil.

14. Reaktivierung der inaktiven Citrat-Lyase

a. Chemische Reaktivierung nach BUCKEL et al. (1971)

Vor der Behandlung mit einem acetylierenden Agenz war die Cl-Aktivität des SH-Enzyms gleich Null. Dem normalen Cl-Test, der die inaktive Cl enthielt, wurde das Acetylierungsmittel zugesetzt, 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert, dann die Reaktion mit Citrat gestartet. Acetanhydrid wurde bis zu einer Konzentration von 1,75 mM und Acetyl-Imidazol bis zu einer Konzentration von 10 mM dem Testansatz zugefügt.

b. Enzymatische Reaktivierung mit ATP und Acetat nach SCHMEL-LENKAMP (1974)

Die enzymatische Reaktivierung des SH-Enzyms wurde in einem Endvolumen von 0,5 ml durchgeführt. Der Inkubationsansatz enthielt: 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2; 2 mM $MgCl_2$; 5 mM Na-acetat; 0,1 mM ATP und 3 E inaktive Citrat-Lyase und unterschiedliche Mengen an DTE. Die Lösung wurde bei 25° C inkubiert; nach 5, 10 ... min wurden 20 µl-Aliquots zur Citrat-Lyase-Aktivitätsbestimmung entnommen. Eine Einheit des acetylierenden Enzyms wurde auf die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bezogen und ist die Menge, die die Bildung von 1 Einheit CL/min katalysiert.
Da keine lag-Phasen in der Reaktivierungskinetik auftraten, handelte es sich tatsächlich um die exakt bestimmbaren Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktivierung. ATP und Acetat konnten im Reaktivierungsansatz durch Acetyladenylat (Endkonzentration 0,6 mM) ersetzt werden.

c. Reaktivierung mit Acetyl-CoA

Eine Reaktivierung des SH-Enzyms (1 E) mit 1 mM Ac-CoA im Inkubationsansatz von 0,5 ml Volumen in Gegenwart von 50 mM KPO_4-Puffer pH 7,2 und 2 mM $MgCl_2$ war möglich, wenn 10 µl Rohextrakt

zugesetzt wurden. Die durch den Rohextrakt bedingte C1-Aktivität wurde abgezogen. Außerdem wurde bei allen enzymatischen Reaktivierungen der durch Mercaptanaustausch des Acyl-Carrier-Protein-SH mit Acetyl-CoA oder Acetyladenylat bedingte Citrat-Lyase-Reaktivierungsanteil berücksichtigt und von der gemessenen Gesamtaktivität abgezogen.

15. Elektrophorese

a. Analytische Disk-Elektrophorese

Untersuchungen und Nachweis der Homogenität von Proteinproben erfolgten in Polyacrylamid-Gelen; zur Verringerung der Porenweite wurde teilweise 0,5% Agarose zugesetzt. Die Polyacrylamid-Gele wurden in Glasröhrchen von 14 cm Länge und 6 mm Innendurchmesser hergestellt. Für das großporige Obergel (Sammelgel) wurden 0,3 ml und für das feinporige Untergel (Trenngel) 2,5 ml evakuierte Gellösung verwendet. Die Lösungen wurden sofort nach dem Einfüllen mit 0,2 ml H_2O bidest. überschichtet, um eine Hemmung der Polymerisation durch eindiffundierenden Luftsauerstoff zu verhindern. Die Polymerisation des Sammelgels erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe (DUL-90, Firma WTW, Weilheim i.OB). Wurde das Mischgel Polyacrylamid/Agarose verwendet, so wurde das Trenngel weggelassen. Zur Durchführung der Elektrophorese wurden Geräte der Firma WTW, Weilheim, benutzt. Über das Stromgerät GT 90 wurden die Kammern mit stabilisiertem Strom versorgt. Die Kammer EA 100 hatte ein Fassungsvermögen von 6, die Kammer DEA 90 von 16 Röhrchen. Eine Schlauchpumpe Typ 100 (Firma Heidolph, Kelkheim) sorgte für die nötige Pufferumwälzung zwischen Anoden- und Kathodenraum der wassergekühlten Trennkammern.

Die Elektrophorese wurde in folgenden Systemen durchgeführt: System A von PEACOCK und DINGMAN (1968) modifiziert nach BEUSCHER (1974); die Systeme B und C sind der Bedienungsanleitung für das Elektrophoresegerät Modell EA 100 entnommen. Die Porengröße wurde modifiziert.

A. Großporgel (3,0%, pH 7,5 + 0,5% Agarose)

a)	1 N HCl	48,0 ml
	Tris	6,85 g
	TEMED	0,46 ml
b)	Acrylamid	12,0 g
	Bis	0,8 g
c)	Ammoniumpersulfat	0,14 g
d)	Agarose	4,0 g

a-d in je 100 ml H_2O bidest. lösen.

Zusammensetzung des Gels:
1 Teil a; 2 Teile b; 4 Teile c; 1 Teil d.

Die Agarose-Lösung wurde vor Zugabe kurz aufgekocht und bei 50° C aufbewahrt. Nach Temperaturangleich der anderen Komponenten des Trenngels auf diesen Wert wurden die Lösungen vereinigt und in Röhrchen gefüllt.

Elektrodenpuffer:	Diäthylbarbitursäure	5,52 g	pH 7,0
	Tris	1,0 g	
	H_2O ad 1 l		

B. Standard-Gel (5,0%, pH 6,6)

a)	1 N KOH	48 ml	b)	1 N KOH	48 ml
	Glycin	114 g		Glycin	4,8 g
	TEMED	0,46 ml		TEMED	0,46 ml
	H_2O ad 600 ml			H_2O ad 100 ml	

c) Acrylamid	40,0 g	d) Acrylamid	10,0 g
Bis	1,6 g	Bis	2,5 g
$K_3Fe(CN)_6$	30,0 mg		
H_2O ad 100 ml.		H_2O ad 100 ml	

e) Ammonpersulfat 0,14 g
H_2O ad 25 ml

Zusammensetzung des Gels:

Unteres Gel:	6 Teile a	Oberes Gel:	1 Teil b
	1 Teil c		2 Teile d
	1 Teil e		4 Teile H_2O
			1 Teil e

Elektrophoresepuffer:

Glycin	13,7 g
2,6-Lutidin (Dimethylpyridin)	38,2 ml
H_2O ad 1 l	

C. Standard-Gel (5,0%, pH 7,7)

a) 1 N HCl	48 ml	b) Acrylamid	20 g
Imidazol	11,7 g	Bis	0,53 g
TEMED	0,24 ml		
1 M KPO_4 (pH 8)	10 ml		
c) Ammonpersulfat	0,14 g	d) 1 N HCl	48 ml
		Imidazol	2,93 g
		TEMED	0,46 ml
e) Acrylamid	10 g	f) Riboflavin	4 mg
Bis	2,5 g		
H_2O ad 100 ml			

Zusammensetzung des Gels:

Sammelgel:		Trenngel:	
1 Teil	d	1 Teil	a
2 Teile	e	2 Teile	b
1 Teil	f	1 Teil	H_2O
		4 Teile	c

Elektrophoresepuffer:

Imidazol	0,465 g
DL-Asparagin	14,4 g

H_2O ad 1 l (pH 7,4)

Puffer wurde konzentriert, 1 : 2 oder 1 : 10 verdünnt eingesetzt.

Durchführung und Auswertung der analytischen Disk-Elektrophorese

Proteinlösungen wurden mit gemahlener Saccharose zu 10%iger Endkonzentration beschwert und mit 10 µl einer 0,05%igen Bromphenolblaulösung als Indikator versetzt. Die Glasröhrchen mit den Gelen wurden in die Kammer eingesetzt und 20-100 µg Protein durch Unterschichtung auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 2 mA/Röhrchen gestartet, bis die Farbbande das Trenngel erreicht hatte; dann wurde auf 3-4 mA/Röhrchen erhöht. Die Laufzeit richtete sich nach dem System. Nach der Elektrophorese wurde in folgender Färbelösung für 2-3 Stunden inkubiert (nach KOENIG et al., 1970):

10 ml einer 1%igen Lösung von Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg) in
400 ml einer Mischung von 60 g TCA in
800 ml H_2O
200 ml Methanol
70 ml Eisessig

Entfärbt wurde mindestens 24 Stunden bei mehrfachem Wechsel von 5%iger Essigsäure oder einer Mischung aus:

120 ml Methanol
20 ml Eisessig
280 ml H_2O

Die angefärbten Proteinbanden der Gele wurden mit einem Flying Spot Densitometer (Firma Vitatron TLD 100, Transmissionslicht, diaphragma: 100 µm, Holland) bei einer Wellenlänge von 609 nm ausgewertet und anschließend in 5%iger Essigsäure aufbewahrt.

Zur weiteren Reinheitsprüfung wurde eine Reelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 6 Röhrchen mit je 50 µg Protein beschichtet und wie oben ausgeführt elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärben eines Gels wurden die entsprechenden Banden aus den ungefärbten Gelen herausgeschnitten, die einander entsprechenden Gelteile vereinigt und versucht, mit Hilfe einer 2 ml Spritze, die mit Sieb und Filter versehen war, die Flüssigkeit aus den Gelen zu pressen. Da dies nicht optimal gelang, wurden die Gelteile mit Puffer versetzt, homogenisiert und abzentrifugiert (20 000 U/min : 20 min). Der Überstand wurde jeweils in einer Minicon A 25 Zelle auf circa 0,1 ml eingeengt, mit Sucrose und Bromphenolblau versetzt und wieder elektrophoretisch aufgetrennt.

b. Vertikale Plattenelektrophorese

Die Methode der vertikalen Plattenelektrophorese wurde in der von STEGEMANN (1972) entwickelten Apparatur durchgeführt. Sie bietet die Möglichkeit, daß mehrere Proben im gleichen Gel und Lauf verglichen werden können. 4 mm starke Gele wurden gegossen, 80 µl Proteinlösung (1 mg/ml) war die günstigste Auftragmenge. Die Polyacrylamidgele hatten folgende Zusammensetzung:

7,5 - 3,0 g Acrylamid
+
375 - 150 mg Bis

in 150 ml des jeweiligen Elektrodenpuffers

1. Tris/Borat, 0,125 M, pH 8,9
2. Diäthylbarbitursäure/Tris, 0,1 M, pH 7,2
3. Imidazol/DL-Asparagin, 0,05 M, pH 7,3
4. Glycin/2,6-Lutidin, pH 6,5

Diese Monomerenlösung wurde filtriert und anschließend mit 50 mg Na-sulfit, 0,1 ml TEMED und 2,8 ml 2%iger Ammoniumsulfatlösung versetzt. 2 min wurde in einer Saugflasche entgast und das Gel luftblasenfrei in die Kammer gefüllt und der Taschenformer eingesetzt. Nach Beendigung der Polymerisation wurde der Taschenformer entfernt und die Kammer aufrecht in eine Schale mit Puffer (Anodenraum) gestellt. Der Kathodenraum wurde ebenfalls bis zur Höhe des Überlaufstutzens mit dem gleichen Puffer gefüllt. Die Pufferzirkulation besorgte eine Schlauchpumpe. Die Proteinproben wurden mit Saccharose (10%) beschwert und 5-100 µl in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit 15 mA und 130-150 Volt durchgeführt, so lange bis die Bande des Indikatorfarbstoffes (bis 200 Volt Bromphenolblau) das Ende der Platte erreicht hatte. Nach 5-6 Stunden wurde die Gelplatte aus der Trennkammer herausgenommen und für eine Stunde pro mm Gelstärke in der beschriebenen Färbelösung angefärbt. Entfärbt wurde in der ebenfalls beschriebenen Mischung auf einer Laborwippe (Firma Müller, Hann. Münden). Die Platten wurden durch Photographie und Densitometer ausgewertet und danach mit 7%iger Essigsäure in Plastikbeuteln eingeschweißt.

c. SDS-Elektrophorese (modifiziert nach WEBER und OSBORN, 1969)

Die Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde in dem beschriebenen Plattenverfahren durchgeführt.

Zusammensetzung des 10%igen Gels:

Acrylamid	15 g
Bis	0,3 g
Na-Sulfit (wasserfrei)	50 mg
TEMED	0,1 ml
Ammoniumpersulfatlösung (2%)	2,8 ml
0,1% SDS in 25 mM $NaPO_4$-Puffer, pH 7,1	150 ml
± 8 M Harnstoff	

Elektrophorese- und Gelpuffer:

A: 179,1 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O zu 1 000 ml H_2O bidest.

B: 69,0 g NaH_2PO_4 x H_2O zu 1 000 ml H_2O bidest.

Zum Gebrauch wurden 34,8 ml A und 15,2 ml B auf 1 000 ml H_2O bidest. aufgefüllt und darin unter leichtem Schütteln 1 g SDS (= 0,1%) gelöst.

Vorbereitung der Enzymproben und Referenzenzyme

Da die Citrat-Lyase in Kalium-Phosphat-Puffer vorlag, mußte sie über Nacht gegen den Elektrophoresepuffer (25 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,1) dialysiert werden. Die Referenzenzyme wurden als Lyophilisat von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen und ebenfalls im Elektrophoresepuffer aufgenommen (1 mg/ml). Die Spaltung der Citrat-Lyase erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1. Dialysiertes Enzym wurde mit 1% SDS und 2 mM DTE versetzt und 2 min bei 100° C im Wasserbad inkubiert.

2. Dialysiertes Enzym wurde mit 1% SDS und 1% 2-Mercaptoäthanol 10 min auf 60° C erhitzt und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert.

3. Dialysiertes und nicht dialysiertes Enzym wurde mit 1% SDS und 2 mM DTE, plus - minus 8 M Harnstoff, 12 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert.

Die Proteinlösungen wurden nach dieser Behandlung mit Sucrose beschwert, mit Bromphenolblau angefärbt und 80 µl pro Geltasche eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 mA und 200 Volt und dauerte im Schnitt 6 Stunden. Färbung, Auswertung und Aufbewahrung erfolgte wie angegeben.

16. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der Citrat-Lyase wurde aus Ergebnissen der Gleichgewicht-Sedimentation-Zentrifugation ermittelt. Die analytische Zentrifugation wurde mit einer Beckman-Spinco Modell E Ultrazentrifuge mit Doppelsektor-Zellen mit Saphirfenstern und 12 mm Lichtweg verwendet. Die Versuche wurden bei 15 000 rpm bei 5° C für verschiedene Proteinkonzentrationen durchgeführt.

17. Elektronenmikroskopie (in Zusammenarbeit mit Prof. Mayer)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Citrat-Lyase in 100 mM KPO_4-Puffer pH 6,2 + 200 mM KCl + 3 mM $MgCl_2$ wurden normalerweise bei einem Proteingehalt von 80-100 µg/ml durchgeführt. Bei Proteinkonzentrationen von 200-1000 µg/ml wurde dementsprechend die Fixierungszeit herabgesetzt. Für die verschiedenen Versuche wurden 2-10 mM DTE oder 10 mM Acetyl-Imidazol oder 50-500 mM KCl oder 0,01-10 mM Citrat oder 0,01-10 mM Tricarballylat dem Puffer zugesetzt.

a. Negativ-Kontrastierungs-Verfahren

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde das Enzym nach dem Negativ-Kontrastierungs-Verfahren präpariert, in Anlehnung an die von VALENTINE et al. (1968) für Glutamin-Synthetase aus E.coli beschriebene Methode. Als Negativ-Kontrastierungsmittel wurde entweder 4%ige Uranylacetatlösung (pH 5) oder 3%ige PTA-lösung (pH 7,0) verwendet.

Fixierung mit 0,5% Formaldehyd oder Glutaraldehyd vor der Negativ-Kontrastierung brachte keine Erhöhung der intakten Enzymmoleküle und wurde für Routineuntersuchungen ausgelassen. Als Kontrolle wurde das Enzym Glutamin-Synthetase aus E.coli unter den gleichen Negativ-Kontrastierungs-Bedingungen untersucht. Als Trägerfolie diente mit Kohle bedampfter Glimmer. Die Enzymmoleküle wurden an den Kohlefilm geheftet, indem der Film auf der Oberfläche der Enzymlösung abflottiert wurde. Nach 10-60 sec wurde der Kohlefilm auf einer Wasseroberfläche 2-3 sec abflottiert, um die Salze der Enzymlösung zu verdünnen, damit die flüssige Schicht durchdringen konnte, die an den Kohlefilm anstößt. Der Kohlefilm mit den adsorbierten und gewaschenen Enzymmolekülen wurde auf das Negativ-Kontrast-Bad überführt (in Beem-Kapseln), wo für 20-120 sec flottiert wurde. Während dieser Zeit wurde das Wasser um die Enzymmoleküle durch Negativ-Kontrast-Lösung ersetzt. Der flottierende Kohlefilm wurde mit einem NEOPREN-Kupfergrid aus der Lösung gehoben und das überflüssige Kontrastmittel mit Filterpapier abgetupft.

b. Elektronenmikrographie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe des Elektronenmikroskops EM 301 (Firma Philips, Eindhofen) angefertigt. Primärvergrößerungen lagen bei 25 000 bis 110 000 x bei einer Beschleunigungs-Spannung von 40-100 KV. Das Mikroskop war mit einem TV-Bild-Übertragungs-System mit Integrator ausgerüstet, um eine Betrachtung der Objekte bei hoher Primärvergrößerung, jedoch geringer Strahlbelastung zu ermöglichen.

c. Bildanalyse

Rotationssymmetrie von photographierten Enzymmolekülen wurde nach der Rotationstechnik nach MARKHAM et al. (1963) durchgeführt.

d. Modellkonstruktion

Die Nachbildung von Enzymmolekülen erfolgte durch Plastikbälle unterschiedlicher Größe. Die Negativ-Kontrastierung wurde dadurch simuliert, daß die Modelle in ein Bad mit schwarzer Tinte getaucht wurden.

18. Dissoziationsversuche mit Harnstoff

Bei den Versuchen zur Dissoziation der Citrat-Lyase in Untereinheiten wurde ein Proteingehalt von 1,5 mg/ml - 7,5 mg/ml in KPO_4-Puffer, pH 7,0 gewählt. Es wurde mit 6 M Harnstoff und 2 mM DTE mehrere Stunden bei 25° C inkubiert. Aliquots wurden jede Stunde entnommen und getestet.

19. Reaggregation der durch Harnstoff zerlegten Enzymmoleküle

In den Reaggregationsversuchen wurden folgende Parameter variiert:

1. Proteinkonzentration:	0,075 mg/ml - 0,375 mg/ml
2. Harnstoffkonzentration:	0,06 M - 0,3 M
3. Ionenkonzentration:	0,05 M - 0,5 M KCl
4. DTE-Konzentration:	0 - 10 mM
5. Temperatur:	25° C - 36° C
6. pH:	6,5 - 8,0

Die mit KPO_4-Puffer verdünnten Enzym-Harnstoff-Testansätze wurden unter verschiedenen Bedingungen über mehrere Stunden inkubiert. Aliquots wurden anfangs alle 15 min, später pro Stunde entnommen und elektronenmikroskopisch untersucht, sowie die Citrat-Lyase-Aktivität bestimmt.

20. Chemikalien und Enzyme

Es wurden handelsübliche p.a. Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt) und J.T. Baker Deventer (Holland) verwendet. Die speziellen Chemikalien und Biochemikalien hatten folgende Herkunft: Firma Pharmacia (Uppsala): Sephadex G-25, DEAE-Sephadex, Sepharose-6B; Firma Serva, Heidelberg: Acrylamid, Bis, TEMED, Ammoniumpersulfat, Coomassie Brilliant Blue R 250, $Al(OH)_3$ Cryo Gel, Riboflavin, Na-Dodesylsulfat, entionisierter Harnstoff, Streptomycinsulfat, RSA, DL-Asparagin; Firma Boehringer & Söhne, Mannheim: Coenzym A, $NADH_2$, ATP, GTP, PEP, Referenzproteine, Lactat-DH (550 U/mg), Malat-DH (1 200 U/mg), Citrat-Lyase (8 U/mg), Hexokinase (10 mg/ml), Pyruvatkinase (10 mg/ml), Myokinase (2 mg/ml); Firma Sigma Chemical Company (St. Louis, USA): Dithioerythritol, Pantothein; Firma T. Schuchardt (München): Isocitrat; Calbiochem. (Los Angeles, Calif. USA): DL-Ba-Fluorcitrat; Firma Difco (Detroit, Michigan USA): Hefeextrakt, Pepton, Lactose; British Drugstore (Poole, England): CTAB.

Acetyladenylat und Cl aus *Rhodopseudomonas gelatinosa* (92 U/mg) wurden von F. Giffhorn zur Verfügung gestellt.

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

I. Nachweis der induktiven Bildung der Citrat-Lyase durch *Streptococcus diacetilactis*

1.1. Wachstumsphysiologische Untersuchungen

1.1.1. Wachstum mit Citrat

HARVEY und COLLINS (1962) wiesen nach, daß die Aufnahme von Citrat durch *Streptococcus diacetilactis* mit Hilfe eines Transportsystems erfolgt, welches induzierbar ist. Da ein Transport gegen einen Konzentrationsgradienten nicht stattfand, scheint es sich um einen Transport durch erleichterte Diffusion zu handeln.

Um zu ermitteln, mit welcher Geschwindigkeit *S. diacetilactis* Citrat verwertet, wurde der Verlauf des Wachstums verfolgt und die Citratabnahme im Nährmedium gemessen. Die Zellen wurden in einer Nährlösung von HARVEY und COLLINS (1961) angezogen, die Citrat in Konzentrationen von 15 mM und 45 mM enthielt (s. METHODEN). Die Tatsache, daß Citrat als zusätzliche Energiequelle die Wachstumsrate und die Ausbeute stimuliert, war schon von CERIOTTI (1952) und BRANEN und KEEMAN (1971) festgestellt worden. Eine vermehrte Acetoinbildung durch Leuconostoc-Arten und *S. diacetilactis* in Gegenwart von Citrat beschrieben VAN BEYNUM und PETTE (1939), MIZUNO und JEZESKI (1959) und WALSH und COGAN (1973).

Anhand der Wachstumskurven (Abb. 1a + b) konnte abgelesen werden, daß *S. diacetilactis* unterschiedliche Citratkonzentrationen mit gleicher Geschwindigkeit abbaute und die stationäre Phase nach Citratverbrauch nicht eingeleitet wurde. Im Gegensatz dazu stand der Wachstumsverlauf von *Leuconostoc citrovorum*, bei dem Citrat wachstumsbegrenzend war (KÜMMEL, 1973). Ein Unterschied bestand bei den Produkten des Citratabbaus und der Zellausbeute.

Eine wesentlich stärkere CO_2-Bildung und Schleimbildung erfolgte bei Zellen, die mit 45 mM Citrat wuchsen, während eine stärkere Ansäuerung des Milieus von pH 6,2 auf 4,8 bei Zellen mit 15 mM Citrat im Vergleich zu pH 6,2 auf 5,4 zu messen war. Das mikroskopische Bild von Zellen mit höherem Substratgehalt unterschied sich durch vermehrte Kettenbildung gegenüber der sonst paarweisen Anordnung der Zellen.

Eindeutig war die Abhängigkeit der Ausbeute von der zugeführten Citratmenge zu erkennen. Wurden die Zellen mit 45 mM Citrat kultiviert, so lag die durchschnittliche Ausbeute bei 7,3 g Feuchtgewicht/Liter Nährlösung, bei 15 mM Citrat bei 4,0 g/l. Der Proteingehalt sank bei Wachstum ohne Citrat auf 1,9 g/l.

Der anaerobe Abbau des Citrats setzt das Vorhandensein eines Enzymsystems voraus, das die Spaltung des Citrats bewirkt; es ist die Citrat-Lyase, deren Aktivität im gekoppelten optischen Test bei 365 nm bequem gemessen werden kann. Die Citrat-Lyase-Aktivität der einzelnen Proben innerhalb der Wachstumsversuche (Abb. 1 + 2) wurde bestimmt und miteinander verglichen. Die Höhe der Aktivität der mit unterschiedlichen Mengen an Citrat gewachsenen Zellen differierte nicht wesentlich. Die Citrat-Lyase-Aktivität durchlief während des Wachstums ein Maximum und pendelte sich nach Eintritt in die stationäre Phase auf einen konstanten Wert ein.

Für die Anreicherung der Citrat-Lyase in größerem Maßstab war es notwendig, möglichst viel Zellmaterial mit hoher CL-Aktivität zur Verfügung zu haben. Die fast doppelt so hohe Zellausbeute bei Wachstum mit 45 mM Citrat wurde der höheren Aktivität bei Wachstum mit 15 mM Citrat vorgezogen, weil damit eine erhebliche Kosten- und Zeitersparnis verbunden war.

Die Massenanzucht erfolgte in einem 385 l-Fermenter, die Zellen wurden zu Beginn der stationären Phase geerntet; das Feuchtgewicht von 7 g/l entsprach den Erwartungen. Die schleimige Zellmasse wurde bei -20° C eingefroren.

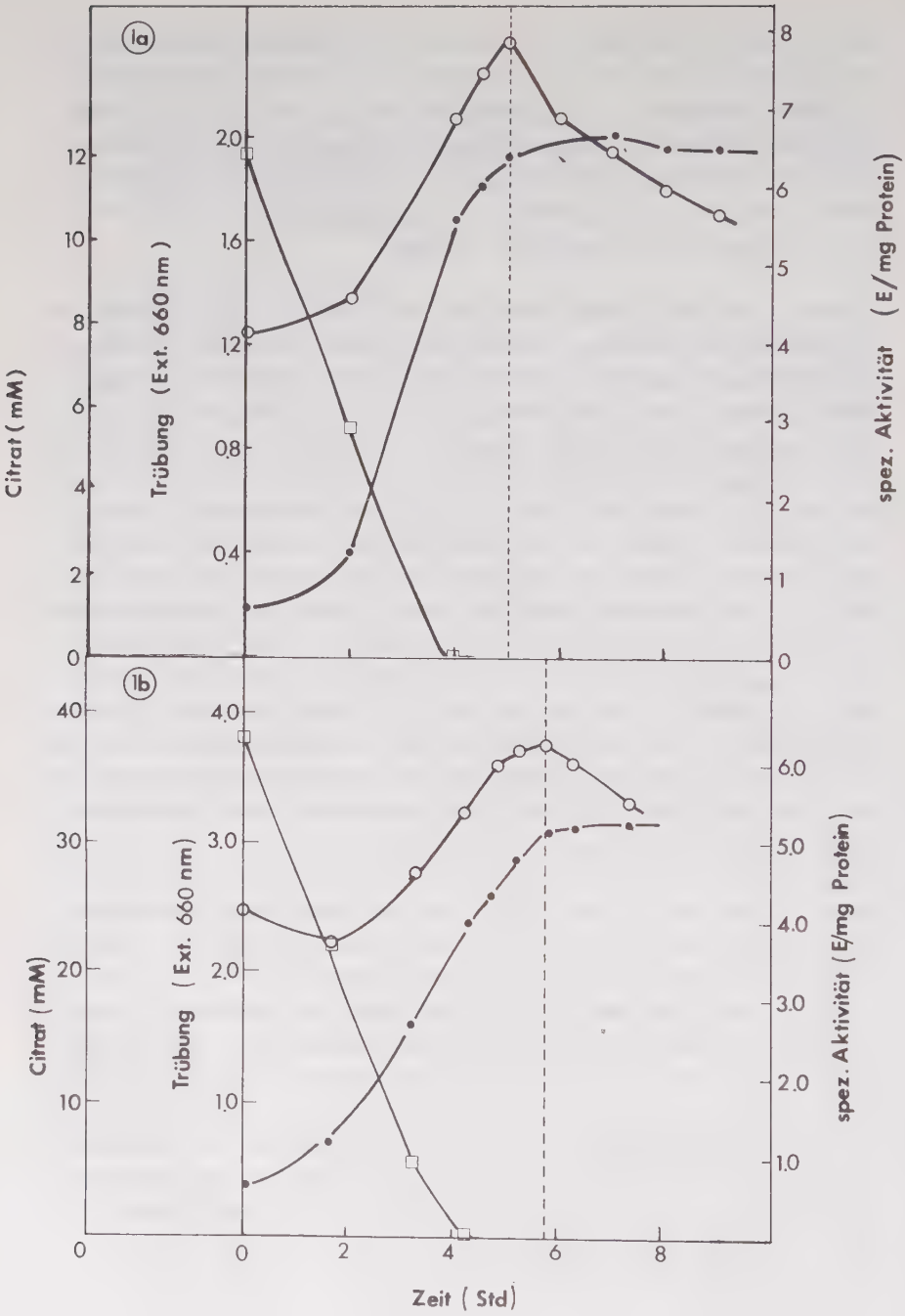

1a
Citrat (mM)
Trübung (Ext. 660 nm)
spez. Aktivität (E/mg Protein)
1b
Citrat (mM)
Trübung (Ext. 660 nm)
spez. Aktivität (E/mg Protein)
Zeit (Std)

Abb. 1a: Wachstum von *S. diacetilactis* in Gegenwart von 15 mM Na-Citrat

—□—□— Citratverbrauch

—•—•— Trübung

—○—○— Aktivität der Citrat-Lyase

Abb. 1b: Wachstum von *S. diacetilactis* in Gegenwart von 45 mM Na-Citrat

Zu Abb. 1a + b: Die Kulturen wurden in 10 1-Flaschen anaerob mit 15 + 45 mM Na-Citrat gezogen. In Abständen wurden Proben entnommen und Zelltrübung, Citratverbrauch, pH und Feuchtgewicht bestimmt (s. METHODEN). Die Citrat-Lyase-Aktivität wurde im Rohextrakt bestimmt, der Testansatz ist unter METHODEN angegeben.

Es stellte sich jedoch heraus, daß die CL-Aktivität durch Einfrieren und Auftauen der Zellen beeinträchtigt wurde und die Aktivität im Zellverband bei Aufbewahrung über mehrere Monate bei -20° C abnahm (Tab. 2). Ein Teil der Anreicherungen wurde deshalb mit frisch geernteten, nicht eingefrorenen Zellen durchgeführt.

Tab. 2: CL-Aktivitätsverlust im Zellverband bei Aufbewahrung bei -20° C

Behandlungsmethode	Lagerungszeit bei -20° C	CL-Aktivität im Rohextrakt E/mg Pr.
a) Zellen aus Flüssigkeitskulturen angezogen, abgeerntet und aufgebrochen	-	6.08 - 7.47
b) Zellen wie unter a) angezogen, bei -20° C eingefroren...	7 Tage	4.04
	1 1/2 Monate	3.59
	3 1/2 "	3.3
	6 1/2 "	3.1
	7 "	1.75
	10 "	0.78

Die Zellen wurden nach der Anzucht sofort 2 x mit 0.1 M KPO_4-Puffer, pH 6,2 + 0,2 M KCl + 3 mM $MgCl_2$ gewaschen und sofort verwendet oder eingefroren (s. METHODEN).

1.1.2. Wachstum ohne Citrat

HARVEY und COLLINS (1961) hatten festgestellt, daß die Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* konstitutiv gebildet wurde. Da bei anderen Milchsäurebakterien wie *L. citrovorum* und *S. faecalis* (KÜMMEL, 1973) ein induzierbares Enzymsystem vorlag und sich innerhalb der Wachstumsversuche mit *S. diacetilactis* gezeigt hatte, daß die CL-Aktivität keinen konstanten Wert hatte, sollte die Konstitutivität überprüft werden.

Die Zellen wurden jeweils geerntet, nachdem sie die stationäre Phase erreicht hatten. Zellen, die in einem Medium mit Citrat gewachsen waren, wurden in Nährlösung ohne Citrat suspendiert (40 ml aus 1 l Citrat-Kulturen) und zum Beimpfen von citratfreier Nährlösung in 1 l-Meßkolben benutzt. Der Rest der Zellen wurde jeweils zur Citrat-Lyase-Bestimmung eingefroren. Zellen in Medium ohne Citrat wuchsen schlechter. Die Wachstumsdauer verlängerte sich auf ein zweifaches der normalen Zeit. Nach siebenmaligem Überimpfen der gewachsenen Kulturen (- Citrat) in Medium ohne Citrat wurde noch zweimal Nährlösung mit Citrat beimpft.

Aus den Ergebnissen in Tabelle 3 ist klar ersichtlich, daß die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* nicht als konstitutives Enzym angesehen werden kann. Es war nur ein Grundlevel an aktivem Enzym während des Wachstums ohne Citrat vorhanden, was in etwa 1/10 der Aktivität während des Wachstums mit Citrat entsprach. Die starke Abnahme der Aktivität erfolgte nicht kontinuierlich über mehrere Passagen, sondern sprunghaft beim Wechsel von citrathaltigem zu citratfreiem Medium.

Das Enzymsystem war sofort nach dem Übergang von citratfreiem Medium in Nährlösung mit Citrat voll aktiv. Die Citrat-Lyase-Aktivität war sogar bedeutend höher als der Ausgangswert. Die Zugabe des Induktors hatte demnach zuerst eine Überproduktion des Enzymsystems zur Folge; erst bei der weiteren Kultur mit Citrat pendelte sich die Aktivität wieder auf den Normalwert ein.

Tab. 3: Bestimmung der CL-Aktivität von *S. diacetilactis* während des Wachstums mit und ohne Citrat.

Reihenfolge der Impfung	Citrat im Medium	Wachstums-dauer (Std.)	Ausbeute (g Feuchtgewicht/l)	Spez.Akt. (E/mg Pr.)
1.	+	16/10	4.07	4.24/5.6
2.	-	11	-	0.876
3.	-	22	-	0.574
7.	-	26	1.95	0.463
8.	+	19	2.77	7.08
9.	+	11	5.2	5.04

Die Citrat-Konzentration im Medium betrug 15 mM.
Der Testansatz für Citrat- und Citrat-Lyase-Bestimmung ist unter METHODEN angegeben.

BUCKEL et al. (1971) wiesen nach, daß die Citrat-Lyase aus *Klebsiella aerogenes* einen kovalent als Thioester gebundenen Acetylrest als funktionelle Gruppe trägt. Das Enzym kann durch Desacetylierung in eine inaktive Form übergehen. Inaktives SH-Enzym konnte chemisch mit Acetanhydrid reaktiviert werden.

Um auszuschließen, daß die Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* während des Wachstums ohne Citrat als inaktives Protein vorlag, wurden die Extrakte der Zellen, die ohne Citrat gewachsen waren, mit Acetanhydrid inkubiert. Eine Erhöhung der CL-Aktivität konnte weder bei den mit Citrat gewachsenen Zellen noch bei den ohne Citrat gewachsenen erzielt werden.

II. Anreicherung und Charakterisierung der Citrat-Lyase

2.1. Anreicherung

2.1.1. Versuche mit zellfreiem Extrakt

Bekanntlich sind Milchsäurebakterien starke Schleimbildner und es besteht die Schwierigkeit, sie so schonend aufzubrechen, daß die bereits gelösten Proteine dabei nicht beschädigt werden. Die aggressive Methode der Ultraschallbehandlung mußte noch durch Zusatz von Aluminiumoxid verstärkt werden, um die Zellen von *S. diacetilactis* zu zertrümmern. Bei der Ultraschallbehandlung durfte die Maximaltemperatur von $+6^{o}$ C nicht überschritten werden, um eine Konformationsänderung des Proteins durch Erwärmung und damit Verlust an katalytischer Aktivität zu verhindern. In METHODEN (Tab. 1) sind die Ergebnisse zur Ermittlung der optimalen Beschallzeit zusammengefaßt. Nach 7 Minuten war die höchste spezifische Aktivität meßbar.

2.1.2. Stabilität der Citrat-Lyase in verschiedenen Puffersystemen

Um zu entscheiden, welcher Puffer für die Stabilität des Enzyms sowie für den Reaktionsansatz am günstigsten war, wurde mit teilweise angereicherter Citrat-Lyase gearbeitet. In Tabelle 4 wurde der Aktivitätsverlust in den verschiedenen Puffersystemen verglichen. Eine deutliche pH-Abhängigkeit und Kältelabilität wurde sichtbar. Da Ammoniumionen offensichtlich die Aktivität der Citrat-Lyase beeinflußten, wurde versucht, mit verschiedenen Salzen das Enzym zu fällen und zu stabilisieren und dadurch die Ammoniumsulfatfällung innerhalb der Anreicherung zu umgehen (s. METHODEN). Jedoch scheiterte der Versuch an der meist zu geringen Löslichkeit der Salze bei 0^{o} C; Versuche mit KCl, K_2SO_4, K-acetat, $MgCl_2$ und NaCl waren durchgeführt worden.

Tab. 4: Stabilität der Citrat-Lyase in verschiedenen Puffersystemen

Zeit (Tage)	% Aktivitätsverlust					
Puffer	Tris/Acetat pH 7,2		50% Ammoniumsulfat-lösung, pH 7,0	KPO_4-Puffer pH 6,2	Lyophilisat -RSA	+RSA
Temperatur	+4° C	-20° C	+4° C	+4° C	+4°C	
0	-	-	-	-	31	
5	1.2	5.2	-	-	31	
8	-	-	65.5	1.0	-	
14	4.2	10.4	-	-	-	
17	-	-	80.0	-	-	
22-24	33.0	45.4	83.0	7.2	-	
28	34.	45.6	-	-	-	
35	34.0	49.5	-	7.3	-	
48	53.5	72.0	-	-	43	20
50	-	-	-	55.0	-	-
60	66.5	72.3	-	60.0	-	-
81	-	-	-	-	57	24

Es wurde mit einem Enzympräparat gearbeitet, welches nach einer Ammoniumsulfatfällung und einem Sepharose-6B-Lauf angereichert vorlag. Die Molarität des Tris-Acetat-Puffers betrug 0,05 M, die des KPO_4-Puffers 0.1 M; zusätzlich waren 0,2 M KCl und 3 mM $MgCl_2$ enthalten. 50%ige Ammoniumsulfatlösung wurde neutralisiert und bei pH 5.0 eingesetzt, wobei in der nicht neutralisierten Lösung der Aktivitätsverlust noch höher lag. Enzym war mit und ohne Zusatz von 1% Rinderserumalbumin als Stabilitätsfaktor lyophilisiert worden.

Am günstigsten wirkte sich KPO_4-Puffer auf die Stabilität des Enzyms aus,und wie sich in späteren Versuchen zeigte, hatte der Aktivitätsverlust des hoch angereicherten Enzyms in diesem Puffer einen noch geringeren Wert. Tris-Puffer wurde in Orientierungsversuchen zur Desacetylierung der Citrat-Lyase verwendet. Zusatz von KCl stabilisierte das Enzym, hemmte aber bei hoher Konzentration (0,9 M) im Testansatz. Zuvor war schon mit beiden Puffern im Reaktionsansatz gearbeitet worden; so verwendeten HARVEY und COLLINS (1963) einen Phosphatpuffer, der allerdings Komplexe mit Mg^{++} bildet (CLARKE, CUSWORTH und DATTA (1954), während SMITH et al. (1956) Tris-Puffer gebrauchten, der mit Oxalacetat reagiert (MAHLER, 1961) und bei Zugabe von Essigsäureanhydrid stören kann.

2.1.3. Durchführung der Anreicherung

Wie unter METHODEN angegeben, wurde nur in den letzten Anreicherungen mit zellfreien Extrakten aus frisch geernteten Zellen gearbeitet, um eine höhere Ausgangsaktivität und im Endeffekt eine größere Ausbeute zu erhalten. Innerhalb der ersten 8 Anreicherungen wurde von tiefgefrorenem Zellmaterial ausgegangen.
Die ausführliche Beschreibung des Anreicherungsvorgangs ist unter METHODEN erfolgt.

Nach Optimierung des Schrittes zur Fällung der Nucleinsäuren wurde in den ersten Anreicherungen das Protein mit Ammoniumsulfat gefällt. Wegen Instabilität des Enzyms mußte auf eine Behandlung mit Aluminiumhydroxid C_f-Gel übergegangen werden. Der Effekt der Anreicherung war unter beiden Methoden gleich. Als günstig erwies sich, daß durch $Al(OH)_3C_f$-Gel ein großer Teil des übrigen Proteins ausgefällt wurde, während sich die Citrat-Lyase im Überstand befand. Unter Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen, deren Ausschlußgrenze bei 10.000 Dalton lag, wurden große Volumina eingeengt.

Die Anreicherungsversuche mit Hilfe der Säulenchromatographie wurden in Anlehnung an BEUSCHER (1974) durchgeführt. Dabei wurde beim Vereinigen der gesammelten Chromatographie-Fraktionen darauf geachtet, daß so wenig wie möglich benachbartes Fremdprotein mit verwertet wurde, was sich zu Ungunsten der Ausbeute auswirkte.

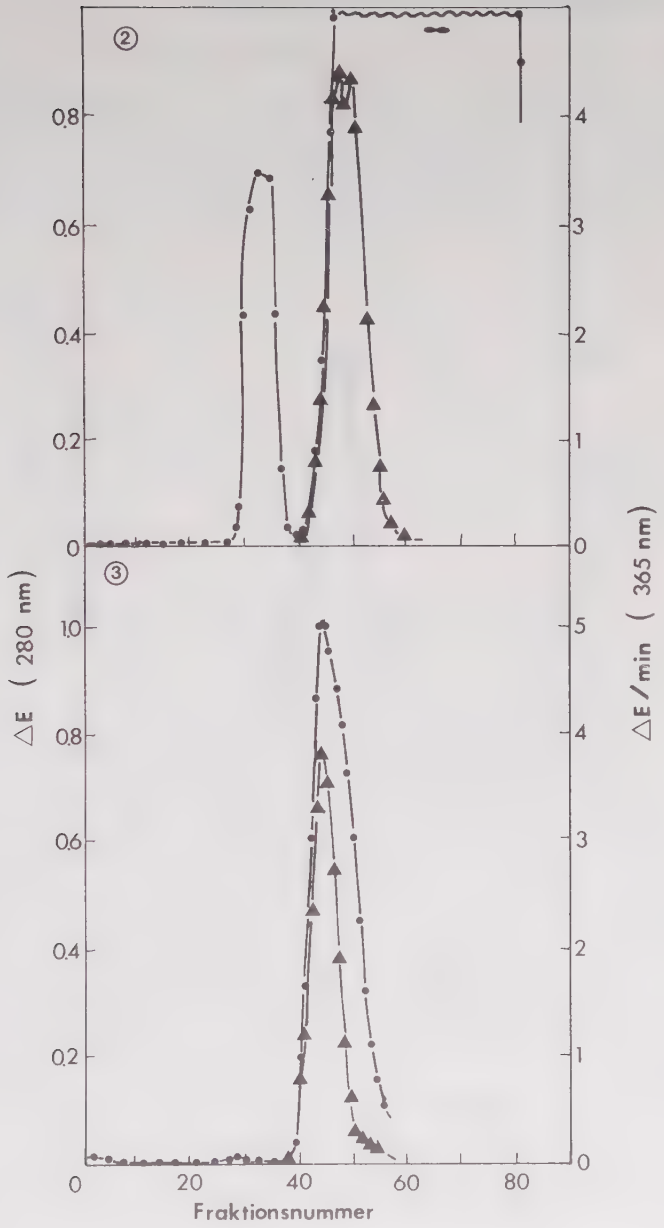
Sepharose-6B-Säulenchromatographie

Es wurde angenommen, daß sich das Molekulargewicht der Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* in der gleichen Größenordnung bewegt wie das entsprechende Enzym aus *Klebsiella aerogenes* oder *Rhodopseudomonas gelatinosa*, für das ein Molekulargewicht von 575 000 (MAHADIK und SIVA RAMAN, 1968) bzw. 545 000 (BEUSCHER, 1974) ermittelt worden war. Das zur Chromatographie verwendete Gel Sepharose-6B trennt im Bereich hoher Molekulargewichte.

Aus dem Elutionsprofil des ersten Sepharose-6B-Laufes (Abb. 2) ist zu erkennen, daß die CL als Schulter des zweiten großen Proteinpeaks erscheint. Zur besseren Reinigung von Fremdprotein war ein zweiter Sepharose-6B-Lauf notwendig (Abb. 3). Im Durchschnitt (aus 11 Anreicherungen) erbrachte der erste Chromatographieschritt eine Anreicherung um den Faktor 5 gegenüber dem vorhergehenden Schritt und reduzierte den Proteingehalt um 85%, während die zweite Gelfiltration eine Verbesserung um den Faktor 1.5 bewirkte. Zu hohe Proteinkonzentrationen durften nicht aufgetragen werden, da die Laufgeschwindigkeit und Trennschärfe darunter litt.

Abb. 2: Sepharose-6B-Säulenchromatographie (1. Lauf)
Säule Ø 2,5 x 90 cm; Fraktionsstärke: 4 ml; Durchflußrate: 16 ml/Std. Durchführung siehe METHODEN. Bestimmung des Proteingehaltes nach WARBURG und CHRISTIAN (1942) bei 280 nm. 10 µl Extrakt wurden jeweils zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt.
—•—•— Protein —▲—▲—Enzymaktivität

Abb. 3: Sepharose-6B-Säulenchromatographie (2. Lauf)


②
③
0.8
0.6
0.4
0.2
0
4
3
2
1
1.0
5
0
20
40
60
80
Fraktionsnummer
△E (280 nm)
△E/min (365 nm)

DEAE-Sephadex-A50-Säulenchromatographie

Außer der Trennung nach der Molekulargröße sollte als Reinheitskriterium einheitliches Verhalten der Enzymmoleküle in der Ionenaustauschchromatographie nachgewiesen werden. Zur Trennung der Proteine werden Unterschiede in der Dissoziation der Amino- oder Carboxylgruppen ausgenutzt. Je nach Stärke der

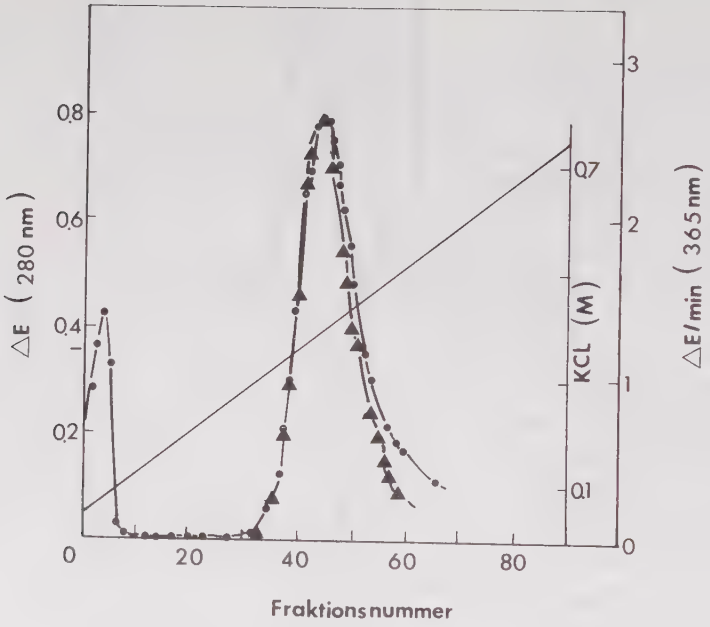


Abb. 4: DEAE-Sephadex-A50-Säulenchromatographie (1. Lauf)

Säule: 0.9 x 15 cm; Fraktionsstärke: 0.8 ml
Durchflußrate: 8 ml/Std.
Elutionspuffer: 100 ml 0.1 M KPO_4 pH 7.0 + 0.05 M KCl + 3 mM $MgCl_2$
100 ml 0.1 M KPO_4 pH 7.0 + 0.75 M KCl + 3 mM $MgCl_2$

—•-•— Protein —▲-▲— Enzymaktivität

Die KCL-Konzentration der Fraktion mit der höchsten Aktivität lag bei 380 mM.

Adsorption werden die Proteine eluiert. Bei dem verwendeten DEAE-Sephadex-A50-Gel wurde sowohl nach Ladungszustand als auch nach Molekülgröße getrennt.

Im Elutionsprofil (Abb. 4) waren Protein- und Aktivitätspeak kongruent, und es durfte angenommen werden, daß das Enzymprotein getrennt von Fremdprotein vorlag. Die KCl-Konzentration der Fraktion mit der höchsten Aktivität lag bei 380 mM. Dieser Reinigungsschritt brachte im Durchschnitt noch einmal eine Anreicherung um den Faktor 1.4 und reduzierte den Proteingehalt um 80% zum vorhergehenden Schritt. Allerdings war dieser Säulenlauf immer mit einem erheblichen Verlust verbunden.

Unterschiede im Elutionsprofil der DEAE-Sephadex-Chromatographien wurden dadurch hervorgerufen, daß Säulen mit unterschiedlichem Volumen (Ø 0,9 x 15 cm; Ø 1,5 x 30 cm) verwendet wurden sowie das Volumen und die Salzkonzentration des Elutionspuffers verändert wurden.

Bei den ersten Anreicherungen wurde das Enzymprotein mit folgendem linearen Puffergradienten eluiert:

a) 150 ml 0.1 M KPO_4 pH 7.0 + 0.05 M KCl + 3 mM $MgCl_2$
b) 150 ml 0.1 M KPO_4 pH 7.0 + 0.75 M KCl + 3 mM $MgCl_2$

In späteren Versuchen wurde das Volumen auf 100 ml reduziert und die Salzkonzentration in Lösung a) auf 0.1 M KCl erhöht. Die Säule war jeweils gegen Puffer a) äquilibriert.

Für Versuche mit hoch angereichertem Enzym und zum Nachweis der absoluten Reinheit für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde ein zweiter DEAE-Sephadex-A50-Säulenlauf durchgeführt. Der hohe Verlust war hauptsächlich auf die Anhebung des pH von 6.2 auf 7.0 vor der Chromatographie und Senken des pH auf 6.2 zur Aufbewahrung des Enzyms zurückzuführen.
Tab. 5 steht stellvertretend für 13 Anreicherungen. In dem beschriebenen Anreicherungsverfahren war die Citrat-Lyase aus

Tab. 5: Anreicherung der Citrat-Lyase aus *Streptococcus diacetilactis*

Anreicherungsschritt	Vol. (ml)	Ges.Protein (mg)	Spez.Aktivität (E/mg Pr)	Ges.Akt. (E)	Ausbeute (%)	Anreicherungs-faktor
Rohextrakt	133	2413	3.3	7980	100	-
CTAB-Überstand	143	1281	6.8	8665,8	109	2.0
Aluminium C_f-Überstand (Ultrafiltrat)	35	622	9.4	5885,6	73	2.86
Sepharose 6B I (Ultrafiltrat Fr.41-54)	9.8	95.2	44.8	4285.24	54	13.5
Sepharose 6B II (Ultrafiltrat Fr.38-47)	7.6	40.6	61.56	2508	31.4	18.65
DEAE-Sephadex A50 (0,9 x 15 cm) (Ultrafiltrat Fr. 37-60)	5.0	7.9	125.0	1000	12	37.8

Schema 1: Anreicherung der Citrat-Lyase aus *Streptococcus diacetilactis*

50 g eingefrorene oder frische Zellen + 140 ml 0.1 M KPO_4-Puffer pH 6.2 + 0,2 M KCl + 3 mM $MgCl_2$ wurden homogenisiert,

▼

mit 5 g Aluminiumoxid versetzt und in 20 ml Portionen 7 min. mit Ultraschallgerät behandelt; Zentrifugation: 20 min bei 17 000 U/min.

▼

Fällung mit 0.2 ml/ml Extrakt einer 2%igen CTAB-Lösung; Zentrifugation: 30 min. bei 17 000 U/min.

▼

Behandlung mit $Al(OH)_3C_f$-Gel: 0.625 ml/ml Extrakt; Zentrifugation: 30 min. bei 17 000 U/min.

▼

Ultrafiltration des $Al(OH)_3C_f$-Überstandes mit Membran PM 10; UF-Zelle 202 + 52; (3 atü)

▼

Versetzen des Extraktes mit 15% Sucrose
1. Gelfiltration mit Sepharose-6B

▼

Ultrafiltration des Eluats mit Membran PM 10; UF-Zelle 52; (3 atü)

▼

2. Gelfiltration mit Sepharose-6B

▼

Ultrafiltration des Eluats mit Membran PM 10; UF-Zelle 52 + 12; (2,5 atü) und Äquilibrierung gegen 0.1 M KPO_4-Puffer, pH 8.3 + 0.05 oder 0.1 M KCl + 3 mM $MgCl_2$ durch wiederholte Konzentrierung und Verdünnung in der Ultrafiltrationskammer

▼

1. Gelfiltration mit DEAE-Sephadex-A50

▼

(Ultrafiltration + 2. Gelfiltration mit DEAE-Sephadex-A50

▼

Ultrafiltration des Eluats mit Membran PM 10; UF-Zelle 12; (2,5 atü) Äquilibrierung gegen 0.1 M KH_2PO_4 pH 4.3 + 3 mM $MgCl_2$ auf einen pH von 6.2

▼

Aufbewahrung bei 4° C

S. diacetilactis 37,8fach angereichert worden mit einer spezifischen Aktivität von 125 E/mg und einer Ausbeute von 12%. Schema 1 gibt einen Überblick über das Anreicherungsverfahren.

Das reine Enzympräparat wurde bei +4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Der Aktivitätsverlust war abhängig davon, in wieweit die Citrat-Lyase während des Anreicherungsverfahren denaturiert worden war. Durchschnittliche Verlustwerte sind in Tab. 6 angegeben.

Tab. 6: Aktivitätsverlust der angereicherten Citrat-Lyase bei Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4° C

Zeit (Tage)	% Aktivitätsverlust	
	1. SA50	2. SA50
3	13	-
19	18	-
35	21	1
88	32	-
94	-	31

Das Enzym war in 0.1 M KPO_4-Puffer pH 6,2 + 3 mM $MgCl_2$ aufgenommen worden (S A50 = DEAE-Sephadex-A50)

2.1.4. Nachweis von oxidierter und reduzierter Citrat-Lyase im angereicherten Enzympräparat

Die Citrat-Lyase-Aktivität nahm innerhalb der Zellen ab, die über Monate bei -20° C lagerten. Um festzustellen, ob die Aktivitätsabnahme auf einer Desacetylierung beruhte,wurden Enzymproben der einzelnen Anreicherungsschritte mit einem Acetylierungsmittel inkubiert. Als Acetylierungsmittel wurde bei diesen Versuchen Acetyl-Imidazol bevorzugt, da es im Gegensatz zu Acetanhydrid wegen seiner geringen Acidität im Überschuß zugesetzt werden konnte. Um festzustellen, wieviel der eventuell desacetylierten Enzym-SH-Stellen oxidiert vorlagen, wurden die Cl-Proben zur Reduktion mit 2 mM DTE vor der Acetyl-Imidazolbehandlung inkubiert.

Eindeutig geht aus diesen Ergebnissen hervor (Tab. 2 + 7), daß die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* im Zellverband bei Aufbewahrung für längere Zeit bei -20° C zum Teil inaktiviert wurde. Die SH-Gruppen der desacetylierten Citrat-Lyase lagen teilweise oxidiert vor, da nach Inkubation mit DTE und Acetyl-Imidazol ein höherer Wert erzielt wurde als nur nach Einwirkung des Acetylierungsmittels. Innerhalb der Anreicherung nahm die Anzahl der oxidierten Stellen zu, die Anzahl der acetylierbaren SH-Gruppen blieb in etwa konstant. Bei hoch angereichertem Enzym war eine Erhöhung der Aktivität durch Acetylierung nur nach Einwirkung eines Reduktionsmittels möglich.

2.2. Prüfung des Reinheitsgrades der angereicherten CL mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.2.1. Analytische Disk-Elektrophorese

ORNSTEIN (1964) und DAVIS (1964) beschrieben die Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen als Trennmethode für Makromoleküle. In der Disk-Elektrophorese liegt hinsichtlich pH-Wert, Pufferzusammensetzung und Gelporengröße ein diskontinuierliches Trenn-

Tab. 7: Nachweis von oxidierter und reduzierter Citrat-Lyase während der Anreicherung

Inkubation	Spez. Akt.	Rohextrakt	1. Sepharose-6B-Gelfiltration	2. Sepharose-6B-Gelfiltration
- Acetyl-Imidazol	(E/mg Pr.)	4.98	36.64	56.8
	= (%)	100	100	100
+ Acetyl-Imidazol	(E/mg Pr.)	6.36	42.77	54.08
	= (%)	127	116.7	95
+ DTE + Acetyl-Imidazol	(E/mg Pr.)	6.67	49.51	71.2
	= (%)	134	135	125

Die Inkubation mit 2 mM DTE erfolgte 5 min vor Zugabe von 10 mM Acetyl-Imidazol. Die Inkubation erfolgte im normalen Citrat-Lyase-Test (s. METHODEN). Nach weiteren 5 min wurde die Reaktion mit Citrat gestartet.

system vor, das Polyacrylamid als Träger verwendet. Polyacrylamid ist das Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid und einem Vernetzer, meist N,N'-Methylenbisacrylsäureamid. Polymerisationsgrad und Vernetzungsgrad und damit das Konzentrationsverhältnis von Acrylamid und Vernetzer bestimmen die physikalischen Eigenschaften des Gels, d.h. Viskosität, Elastizität und durchschnittliche Porengröße.

Die hohe Trennfähigkeit bei der Disk-Elektrophorese kommt durch die Kombination verschiedener Trennmethoden zustande: 1. der elektrophoretischen Beweglichkeit mit Konzentrierungseffekt, wobei in Anwendung der Kontinuitätsfunktion nach KOHLRAUSCH (1897) die Substanzen konzentriert werden und 2. dem Molekularsiebeffekt, wonach die einzelnen Moleküle elektrophoretisch nicht nur nach ihrer elektrischen Gesamtladung, sondern auch nach Größe (Molekulargewicht) und Gestalt (Tertiärstruktur) getrennt werden.
Bevor ein Enzympräparat als rein bezeichnet werden kann, müssen z.B. pH-Wert und Gelkonzentration variiert werden, um gleiche reproduzierbare Ergebnisse unter verschiedenen Bedingungen zu erhalten. Homogenität im Neutralbereich ist nicht aussagekräftig, da die Amino- und Carboxylgruppen weitgehend undissoziiert vorliegen und die Leitfähigkeit dementsprechend gering ist.

Die Interpretation der Ergebnisse bleibt schwierig, da z.B. durch Dissoziation eines reinen Enzympräparates eine Heterogenität durch Auftreten mehrerer Banden vorgetäuscht werden kann.

Die Reinheit der Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* wurde bereits im Elutionsdiagramm des DEAE-Sephadex-A50-Säulenlaufes durch Identität von Protein- und Aktivitätsprofil dokumentiert, sollte aber mit Hilfe der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese belegt werden. In orientierenden Versuchen in Gel mit mittlerer Porengröße wurde deutlich, daß der Anteil von 7,5% Acrylamid zu hoch war, was sich in einer kurzen Wanderungs-

strecke des Proteins äußerte. Der Acrylamidanteil wurde in den verschiedenen Systemen verringert (Tab. 8). Die besten Ergebnisse wurden in System A, modifiziert nach BEUSCHER (1974), erzielt.

Tab. 8: Überblick der verwendeten Trennsysteme

System	Träger (%)	Vernetzer (%)	pH	E.-Puffer	Laufzeit (Std.)
A	3 + 0,5 Agarose	0,2	7,5 7,0	Tris/ Diäthylbarbitursr.	2,5
B	5	0,2	6,6	Glycin/ 2,6-Lutidin	4
C	5	0,13	7,7	Imidazol/ DL-Asparagin	6 - 12

Der Puffer aus System C wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Bei System A wurde teilweise kein Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 3 mA/Röhrchen. Durchführung siehe METHODEN.

In Abb. 5 ist die zunehmende Anreicherung der Citrat-Lyase deutlich zu erkennen. Es wurde versucht, die Schwanzbildung durch Verwendung eines Sammelgels, Herabsetzung der Salzkonzentration in der Probe, Herabsetzung der Stromstärke und Vorelektrophorese zu unterbinden, allerdings nur mit geringem Erfolg.
Meistens traten in allen 3 Gelsystemen mit gereinigtem Enzympräparat 2 Banden auf, die sich nicht in der Form, wohl aber in der Intensität unterschieden (Abb. 6). Die Stärke der zweiten Bande variierte. Die densitometrische Auswertung (Abb. 7) ergab, daß der Anteil der zweiten Bande erheblich geringer war, als es den Anschein hatte. Die Vermutung lag nahe, das Auftreten der zweiten Bande mit einer Dissoziation des Enzymproteins zu erklären, zumal nach Alterung der Citrat-Lyase

eine einzige Bande nicht mehr erhalten wurde. Die Vermutung konnte innerhalb eines Versuches bestätigt werden, indem eine Bande für die Citrat-Lyase nach der 1. Gelfiltration an Sepharose-6B auftrat, die zusätzliche zweite Bande schwach nach dem 2. Sepharose-6B-Lauf und scharf nach vollständiger Reinigung an DEAE-Sephadex-A50 zu erkennen war. An die Stelle einer Bande waren zwei getreten.

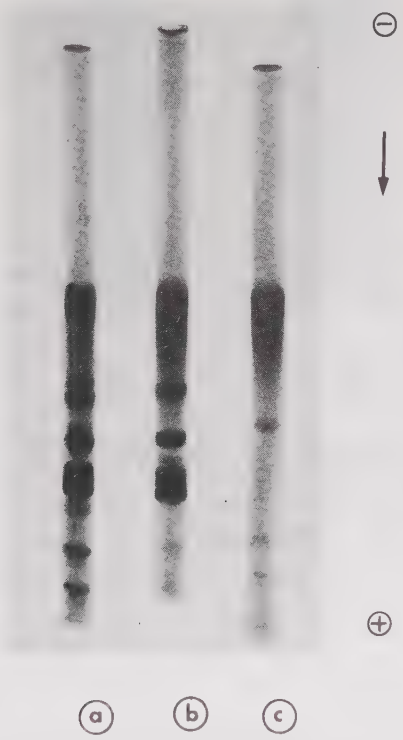


Abb. 5: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Citrat-Lyase nach der 1. und 2. Gelfiltration an Sepharose-6B (a und b) und der Chromatographie an DEAE-Sephadex-A50 (c).

Die Elektrophorese erfolgte in System A pH 7,0. 70 µg Protein bei a, 58 µg bei b, 52 µg bei c wurden aufgetragen und innerhalb von 2,5 Stunden bei 3 mA/Röhrchen aufgetrennt. Die Anfärbung wurde mit Comassie Blue durchgeführt.

Abb. 6a + b: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Citrat-Lyase nach Chromatographie an DEAE-Sephadex-A50

6a) Die Elektrophorese erfolgte in System A pH 7,5.

6b) Die Elektrophorese erfolgte in System A pH 7,0.

Jeweils 52 µg Protein wurden aufgetragen.

Legende zu Abb. 7a + b

In Abb. 7a ist ein Lauf aus System A pH 7,5 wiedergegeben (60 µl Protein), stellvertretend für die Läufe aus System A, B und C mit 2 Banden. Die zweite Bande trat als mehr oder weniger gut abgegrenzte Schulter auf.
In Abb. 7b ist ein Lauf aus System A pH 7,0 (30 µl Protein) wiedergegeben.

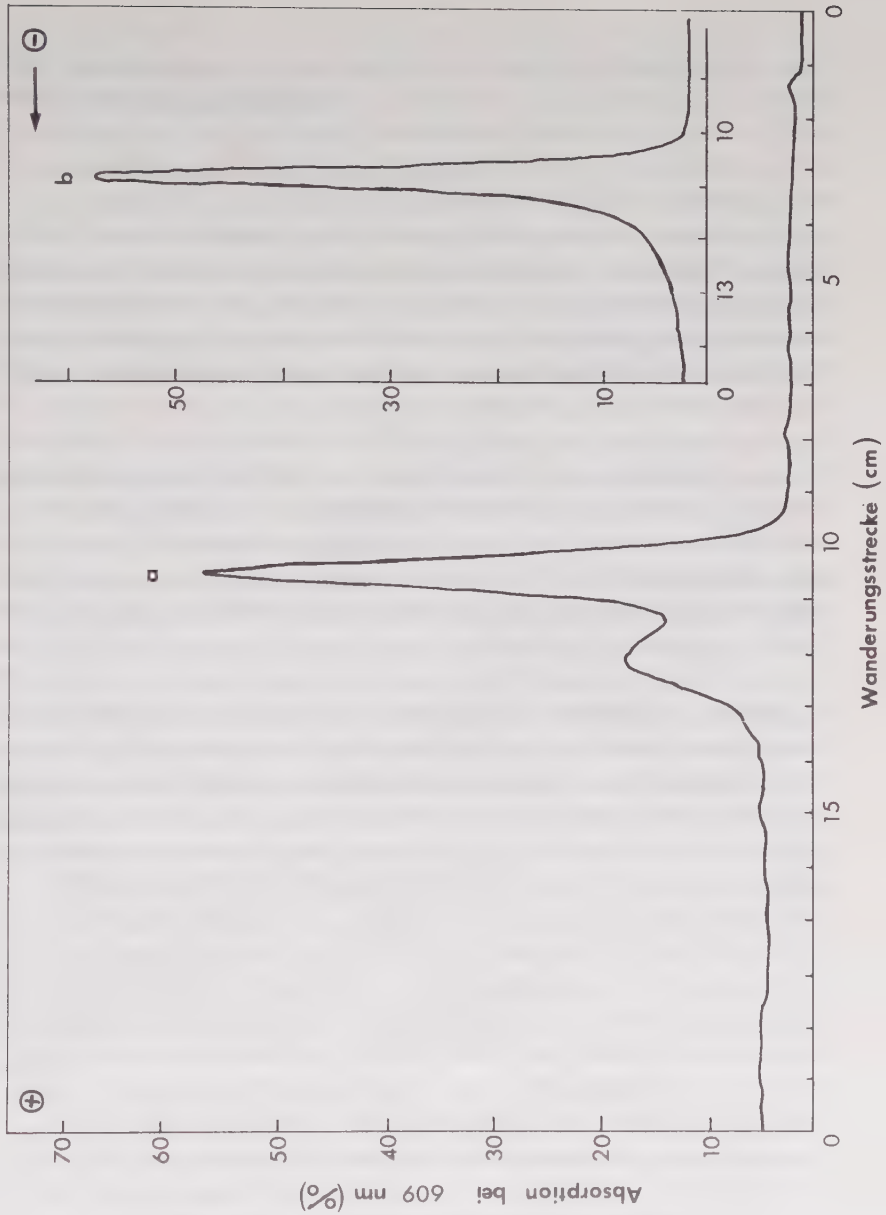


Abb. 7a + b: Densitogramm zweier Elektrophoreseläufe mit hochgereinigter Citrat-Lyase

Eine Re-Gelelektrophorese des Proteins der beiden Banden bei System C brachte keine wiederholte Aufspaltung. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß keine Dissoziation des Proteins erfolgte, jedoch war die Intensität der Banden zu schwach, um mit Sicherheit eine Auftrennung ausschließen zu können.
Die Laufgeschwindigkeit in System C lag erheblich über den Werten für System A und B und war abhängig von der Konzentration des Elektrophoresepuffers. Je länger das Enzympräparat, welches sich sehr labil im alkalischen Bereich verhielt, den Elektrophoresebedingungen ausgesetzt war, um so größer war die Möglichkeit der Dissoziation.

Um die Identität der Proteinbanden als Citrat-Lyase zu kontrollieren, wurden Aktivitätsbestimmungen im Gel durchgeführt; jedoch war nach der Elektrophorese keine enzymatische Aktivität mehr meßbar, während die Citrat-Lyase in dem verwendeten Gel- und Elektrodenpuffer (Tris/Diäthylbarbitursäure) länger als zwölf Stunden aktiv blieb.

In Kontrollversuchen mit kontinuierlicher Platten-Elektrophorese, deren Unterschied zur Disk-Elektrophorese in der Konstanz des pH-Wertes über den gesamten Gelbereich und in der Möglichkeit des Vergleichs mehrerer Proben unter identischen Bedingungen besteht, konnten keine Ergebnisse zur besseren Interpretation der Banden erzielt werden. In den verschiedenen Systemen (Ausführung siehe METHODEN) a) Tris/Borat pH 8,9; b) Diäthylbarbitursäure/Tris pH 7,2; c) Glycin/Borat pH 5,3; d) Imidazol/DL-Asparagin pH 7,3; e) Glycin/2,6-Lutidin pH 6,5 traten fast immer eine starke und eine schwache Bande auf. Versuche von SINGH und SRERE (1975) bestätigten das Auftreten mehrerer Banden für das reine Enzympräparat von *S. diacetilactis*. BOWEN und MORTIMER (1971) erklärten das Auftreten von mehreren Banden für die reine Citrat-Lyase von *K. aerogenes* in der Disk-Elektrophorese als Polymere oder verschiedene Aggregate von Untereinheiten oder beides.

2.3. Bestimmung des Molekulargewichtes der Citrat-Lyase und ihrer Untereinheiten

2.3.1. Analytische Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation war es möglich, die Reinheit der Citrat-Lyase zu überprüfen, sowie das Molekulargewicht des Enzyms zu bestimmen. Die Empfindlichkeit der Sedimentations-Gleichgewichts-Methode im Bestimmen von Heterogenität besteht darin, daß in Gegenwart einer zweiten Proteinkomponente sich die Auftragung log c gegen r^2 in einer Beziehung exponentieller und nicht linearer Art äußern würde (VAN HOLDE, 1967; YPANTIS, 1964). Abb. 8 dokumentiert eine Linearität und damit die Homogenität des Enzympräparates.

Bei Sedimentationsmessungen werden die Proteinlösungen Schwerefeldern von mehrhunderttausendfacher Erdbeschleunigung ausgesetzt. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wird mit optischen Methoden gemessen. Das Molekulargewicht wurde nach VAN HOLDE und BALDWIN (1958) mit einer Beckman-Spinco Modell E Ultrazentrifuge bestimmt, die mit Monochromator, Multiplexer und photoelektrischem Scanner ausgerüstet war. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei niedriger Geschwindigkeit für verschiedene Proteinkonzentrationen ($O.D._{280\ nm}$ = 0,09 - 0,7) in Gegenwart von 3 mM $MgCL_2$, wodurch nach BOWEN und MORTIMER (1971) eine Dissoziation des Enzymkomplexes verhindert wurde. Abb. 8 zeigt die Auftragung von log c gegen r^2 und Abb. 9 die Extrapolation für eine Reihe von $M_{app.}$-Werten, die auf eine Proteinkonzentration von c = 0 bezogen wurden. $M_{app.}$ errechnet sich aus:

$$M_{app.} = \frac{2 \times R \times T \times \log c \times 2{,}303}{(1 - V_2 \varrho) \times \omega^2}$$

$$\frac{1}{M_{c=0}} = 0.185$$

$$M_{c=0} = 540\ 500$$

Dabei bedeuten $M_{app.}$ = Molekulargewicht unter Meßbedingungen, R = allgemeine Gaskonstante = $8{,}3149 \cdot 10^7$ erg/Mol Grad, T = absolute Temperatur (K), V_2 = partialspezifisches Volumen des Proteins = 0,73 ml/g, ρ = spezifische Dichte der Lösung = 1 g/ml, ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors in rad/sec = Upm $\cdot \frac{2\pi}{60}$, c = Proteinkonzentration (Ext. 280 nm).

Die Gerade (Abb. 9) wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt, wobei sie der Funktion $\frac{1}{M_{app.}} = m \cdot c + b$ unterliegt. Für c = 0 ist

$$b = \frac{1}{M_{c=o}} = 0.185 \cdot 10^{-4}.$$

Das errechnete Molekulargewicht für die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* betrug $M_{c=o}$ = 540 500. Dieser Wert stimmte gut mit den Molekulargewichten für die Citrat-Lyase von *Klebsiella aerogenes* mit 575 000 (MAHADIK und SIVA RAMAN, 1968), 550 000 (BOWEN und MORTIMER, 1971), 560 000 (SINGH, CARPENTER und SRERE, 1974) sowie für die Citrat-Lyase von *R. gelatinosa* mit 545 000 (BEUSCHER, MAYER und GOTTSCHALK, 1974) überein.

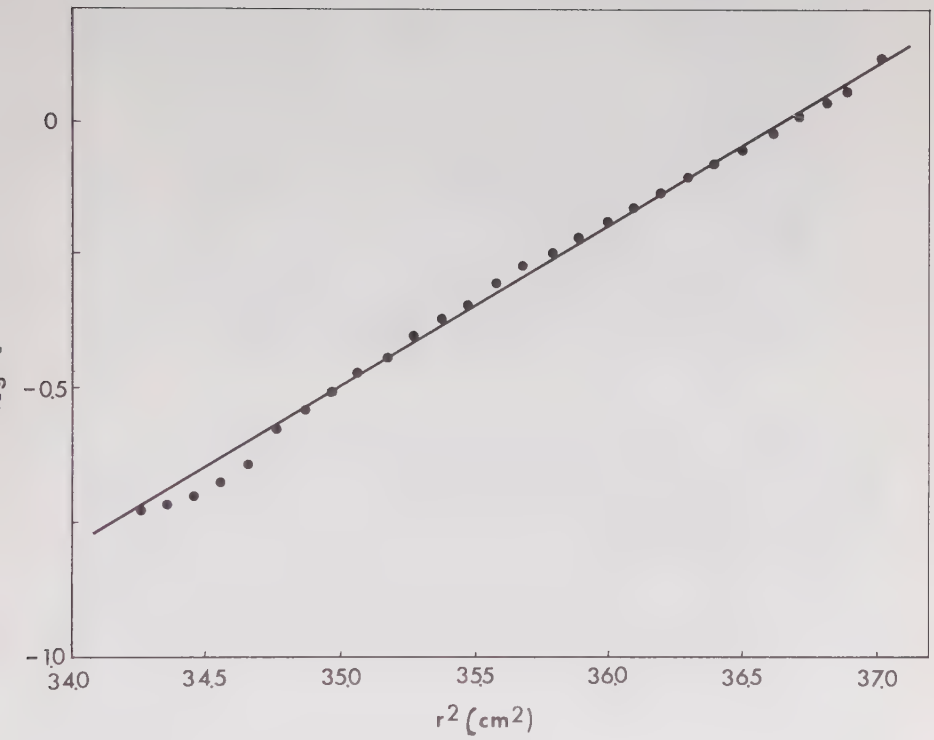


Abb. 8: Gleichgewichts-Sedimentations-Bestimmung des Gesamtmoleküls der CL in der analytischen Ultrazentrifuge

log c = Logarithmus der Proteinkonzentration ($E_{280\ nm}$)

r^2 = Abstand von der Rotationsachse (cm^2)

Durchführung siehe METHODEN.

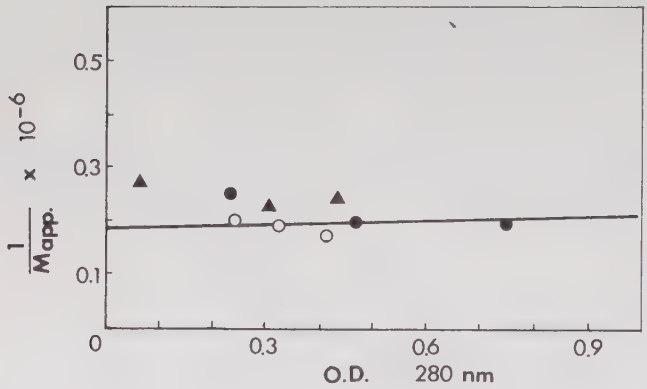


Abb. 9: Berechnung des Molekulargewichtes für das reine Enzympräparat.

$M_{app.}$ = Molekulargewicht unter Meßbedingungen
O.D. = Messung der Proteinkonzentration bei 280 nm

Berechnung siehe Text. Das partial-spezifische Volumen wurde mit 0,73 ml/g angenommen.
Durch unterschiedliche Symbole sind drei Meßserien gekennzeichnet.

2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese zur Bestimmung von Anzahl und Molekulargewicht der Untereinheiten

Versuche mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese hatten eine mögliche Dissoziation der Citrat-Lyase erkennen lassen. Die Vermutung lag nahe, bei einem Enzym mit hohem Molekulargewicht eine Aufspaltung in Untereinheiten zu erhalten. Für die Citrat-Lyase aus *K. aerogenes* waren durch BOWEN und MORTIMER (1971) Untereinheiten von 55 000 und 33 000, durch SINGH et al. (1974) von 55 800, 33 800 und 11 900 sowie durch DIMROTH und EGGERER (1975d) von 54 000, 32 000 und 10 000 ermittelt worden. BEUSCHER et al. (1974) bestimmten für *R. gelatinosa* Untereinheiten von 60 000 und 30 000. Bei Untersuchungen über den Pantothensäuregehalt in der CL von *S. diacetilactis* konnten SINGH et al. (1974) eine Untereinheit vom Molekulargewicht ~10 000 nachweisen.

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können reduzierte Proteine in die nativen Polypeptidketten als Funktion ihrer Molekulargewichte aufgetrennt werden (WEBER und OSBORN, 1969; FISH et al., 1970). Ihre elektrophoretische Beweglichkeit ist dem dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte proportional (SHAPIRO et al., 1967). Durch Vergleich mit Referenzproteinen bekannter Molekulargröße kann in der Elektrophorese das Molekulargewicht der einzelnen Polypeptidketten bestimmt werden.
Die elektrophoretische Beweglichkeit (Rf-Werte) wurde nach WEBER und OSBORN (1969) berechnet:

$$Rf = \frac{\text{Wanderungsstrecke Protein}}{\text{Gellänge nach Entfärben}} \times \frac{\text{Gellänge vor Anfärben}}{\text{Wanderungsstrecke Indikatorfarbstoff}}$$

Für den Erfolg der SDS-Elektrophorese ist es wichtig, daß das Enzymprotein vollständig denaturiert und reduziert vorliegt. Die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* wurde unter verschiede-

nen Bedingungen mit 0,1% SDS und einem Reduktionsmittel (siehe METHODEN) präinkubiert. Die SDS-Elektrophorese wurde in einem 10%igen Gel durchgeführt. In Kontrollversuchen wurde zur Präinkubation und im Trenngel 8 M Harnstoff verwendet, der einen zusätzlichen Siebeffekt durch Verèngung der Porengröße hervorruft (SWANK und MUNKRES, 1971). Anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blue ließ drei verschiedene Polypeptidketten für die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* erkennen (Abb. 10).

Im Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit der 3 Banden mit den Polypeptidketten von Katalase, Aldolase, Chymotrypsinogen A und Cytochrom C konnte im Durchschnitt ein Molekulargewicht von 53 500, 36 300 und 11 400 ermittelt werden (Abb. 11). Nach der Behandlung mit Harnstoff wurden Werte von 55 000, 35 900 und 12 500 für die Untereinheiten erzielt. Bei Alterung des Enzyms traten mehr als drei Banden auf.

Die quantitative Bestimmung der Molekulargröße erfolgte durch densitometrische Auswertung der Gelplatten (Abb. 12). Das Verhältnis der Untereinheiten 53 500 zu 36 300 war nach Probe 7 (Abb. 10) 1,16 : 1, nach Probe 8 (Abb. 10)1,24 : 1, bestimmt durch Auswiegen der aus dem Papier geschnittenen entsprechenden Flächen.
Das molare Verhältnis von 1 : 1, was für die beiden Untereinheiten der CL aus *R. gelatinosa* besteht, wurde für *S. diacetilactis* nicht erhalten. Es konnte nachgewiesen werden, daß sich bei Alterung des Enzyms das Verhältnis verschob.

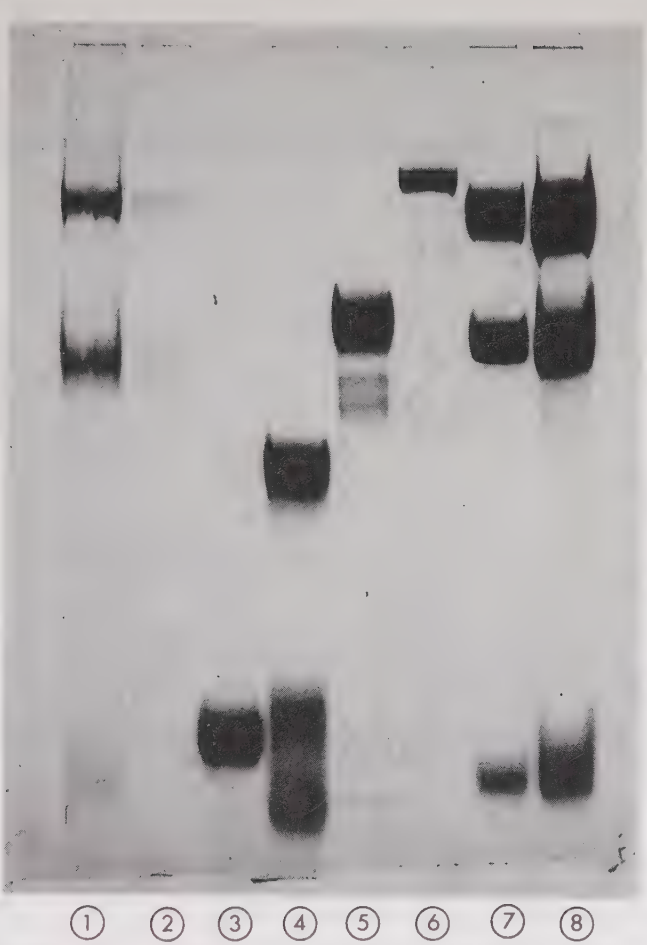


Abb. 10: SDS-Elektrophorese in einem 10%igen Polyarylamidgel
Laufzeit: 6 Std., bei 100 mA und 200 Volt

Probennr.

1	48 µg Citrat-Lyase aus *R. gelatinosa*
2	24 µg Citrat-Lyase aus *R. gelatinosa*
3	50 µg Cytochrom c
4	50 µg Chymotrypsinogen A
5	50 µg Aldolase
6	50 µg Katalase
7	50 µg Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis*
8	50 µg Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis*

Enzym und Referenzproteine wurden unter gleichen Bedingungen denaturiert (s. METHODEN).

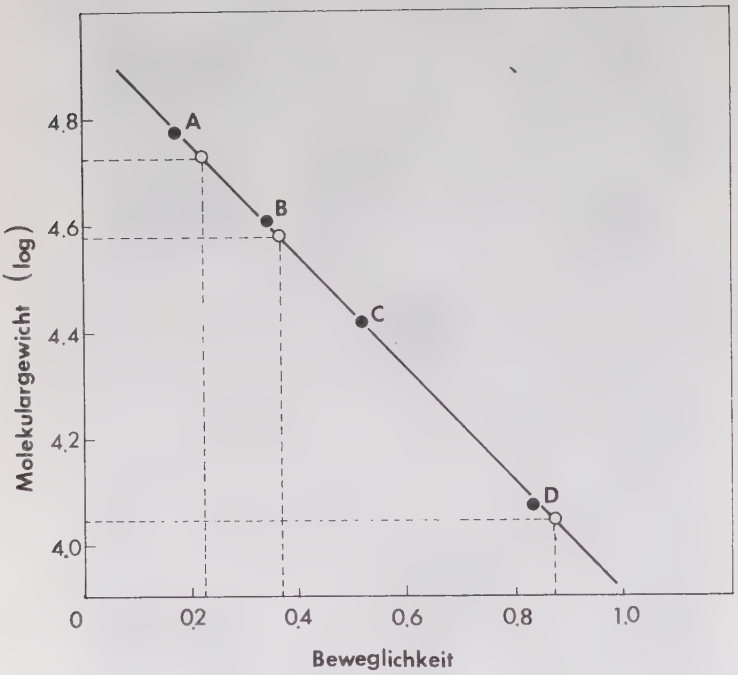


Abb. 11: Bestimmung des Molekulargewichtes der CL-Untereinheiten

Die Eichproteine entstammten der Combithek BOEHRINGER, Mannheim. Die Molekulargewichte wurden von WEBER und OSBORN (1969) übernommen:

A :	Katalase	58 000
B :	Aldolase	40 000
C :	Chymotrypsinogen A	25 700
D :	Cytochrom c	11 700

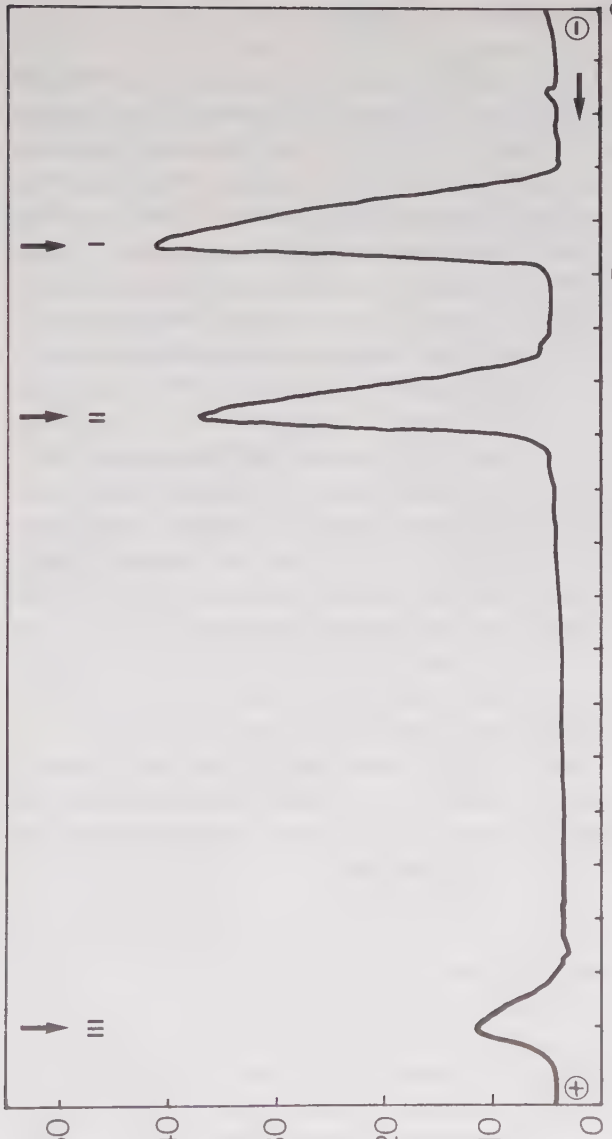


Abb. 12: Densitometrische Auswertung einer dissoziierten Citrat-Lyase-Probe nach SDS-Gelelektrophorese

Es handelt sich um die Proteinprobe Nr. 7 aus Abb. 10

I Untereinheit: 53 000 Dalton
II Untereinheit: 36 300 Dalton
III Untereinheit: 11 400 Dalton

2.4. Kinetische Untersuchungen der Citrat-Lyase

2.4.1. Metallionenbedürfnis, pH-Optimum

DAGLEY und DAWES (1955) ermittelten, daß für die enzymatische Aktivität der Citrat-Lyase ein absolutes Bedürfnis an zweiwertigen Metallionen wie Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} besteht. Die Autoren, sowie HARVEY und COLLINS (1963), TATE (1963)vermuteten, daß ein Metallcitratkomplex auf das Enzym einwirkt. WARD und SRERE (1965) leiteten jedoch aus magnetischen Kernresonanzstudien die Reaktion eines Metall-Enzyms mit freiem Citrat für die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* ab. Ternäre Komplexe zwischen Citrat, Metall und Enzym konnten nicht nachgewiesen werden. Dagegen hemmten Ca^{+}-Ionen die Enzymaktivität. BLAIR, DATTA und TATE (1967) beobachteten, daß nicht nur EDTA, sondern auch ATP, aufgrund seiner Fähigkeit,mit divalenten Metallionen Chelate zu bilden, das Enzym inaktivierte. Für die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* war die Enzymaktivität in Gegenwart von EDTA herabgesetzt. Die Aktivität von hoch angereichertem Enzym war mit Mn^{2+}-Ionen höher als mit Mg^{2+}-Ionen im Gegensatz zu weniger angereichertem Enzym.

Das pH-Optimum wurde in dem Bereich von pH 4-8 mit dem Kombinationspuffer nach BRITON und im Bereich von pH 8 - 10 mit Glycinpuffer nach SÖRENSEN bestimmt. Der optimale Testbereich lag zwischen pH 7,0 und 7,4. HARVEY und COLLINS (1961) hatten mit Phosphatpuffer und Trispuffer einen optimalen Bereich zwischen pH 7,4 und 7,6 gefunden.

2.4.2. Reaktionsinaktivierung

Die Citrat-Lyase aus *K. aerogenes* wird während der Reaktion, die sie katalysiert, inaktiviert. SINGH und SRERE (1971) stellten fest, daß die Anfangsgeschwindigkeit und der Grad der Reaktion bis zur vollkommenen Inaktivierung abhängig ist

von der Art der Metallionen und der eingesetzten Enzymmenge und hatten diese Inaktivierung treffend als "suicide" bezeichnet. Sie widerlegten in ihrer Arbeit die Annahme von WHEAT und AJL (1955b), daß eine Produkthemmung durch Oxalacetat erfolgt und stellten fest, daß die bekannte, bei Inkubation der Citrat-Lyase mit OAA erfolgende Hemmung ebenfalls eine Reaktionsinaktivierung war (DAGLEY und DAWES, 1955; HARVEY und COLLINS, 1961; BOWEN und MORTIMER, 1963; TATE und DATTA, 1964). BUCKEL et al. (1971) erklärten die Reaktionsinaktivierung als Folge der Hydrolyse des intermediären Citryl-S-Enzyms. BLAIR, DATTA und TATE (1967) zeigten eine Inaktivierung der CL von *K. aerogenes* in verdünnten Enzymlösungen mit niedriger Mg^{2+}-Konzentration. Eine teilweise Reaktivierung war durch Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration möglich.

In Anlehnung an die Versuche mit den Milchsäurebakterien *L. citrovorum* und *S. faecalis* (KÜMMEL, 1973) wurde die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* auf Reaktionsinaktivierung durch Citrat geprüft und mit dem Verhalten der Lyasen von *R. gelatinosa, K. aerogenes* und *L. citrovorum* verglichen (Abb. 13). Bei Mg^{2+}-Konzentrationen von 0,1 oder 2 mM wurden 0,1 E von jeder der vier Lyasen mit 0,1 µmol Citrat inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde wiederholt 0,1 µmol Citrat zugefügt.

Deutlich ist die Inaktivierung des Enzyms aus *K. aerogenes* zu erkennen. Bei der ersten Citratzugabe erfolgte keine vollständige Spaltung des Substrats, nach der zweiten Zugabe fand keine Reaktion mehr statt. Eine Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration blieb ohne Erfolg. Die Lyase von *R. gelatinosa* war ebenfalls inaktiv, nachdem der größte Teil des zugeführten Citrats gespalten worden war. Das Ausmaß der Reaktionsinaktivierung war jedoch sichtbar geringer bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 2 mM. Die Citrat-Lyasen von *S. diacetilactis* und *L. citrovorum* zeigten unter diesen Bedingungen keine signifikante Reaktionsinaktivierung. Kontrollansätze wurden durchgeführt, in denen die Enzyme für 10 min und 20 min ohne Citrat im Testansatz inkubiert und dann mit 0,1 µmol Citrat getestet wurden. Es konnte

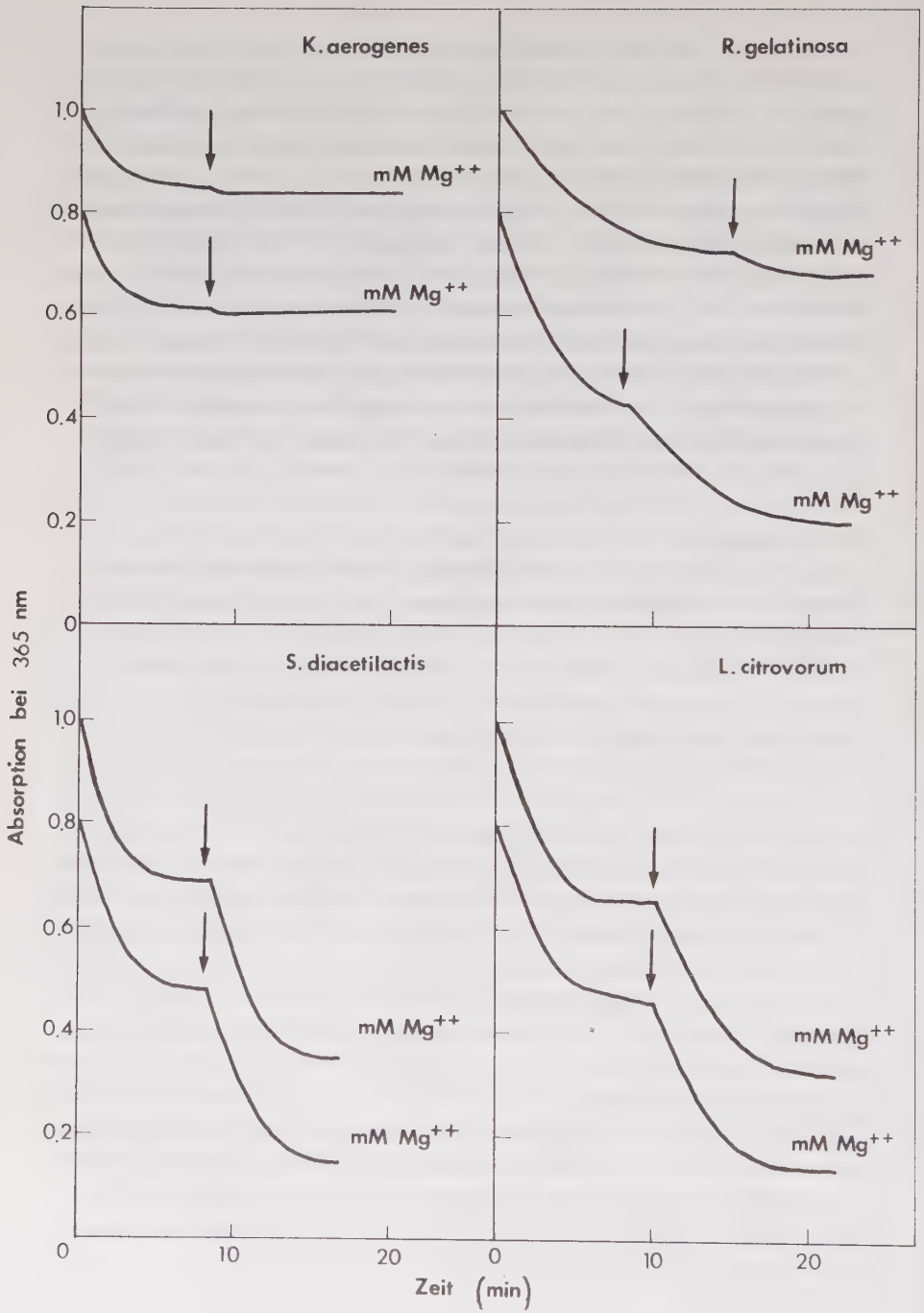

K. aerogenes
R. gelatinosa
S. diacetilactis
L. citrovorum
mM Mg++
Absorption bei 365 nm
Zeit (min)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
10
20

Abb. 13: Unterschiede in der Reaktionsinaktivierung vier verschiedener Citrat-Lyasen während der Inkubation mit Citrat

Der Testansatz enthielt in 1 ml: 50 mM Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 7.4; 0.3 mM $NADH_2$; 10 µg MDH; 0,1 E Citrat-Lyase und $MgCl_2$ in Konzentrationen wie angegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 µmol K-Citrat gestartet. Zum Zeitpunkt, der durch einen Pfeil markiert ist, wurden weitere 0,1 µmol Citrat zugefügt.

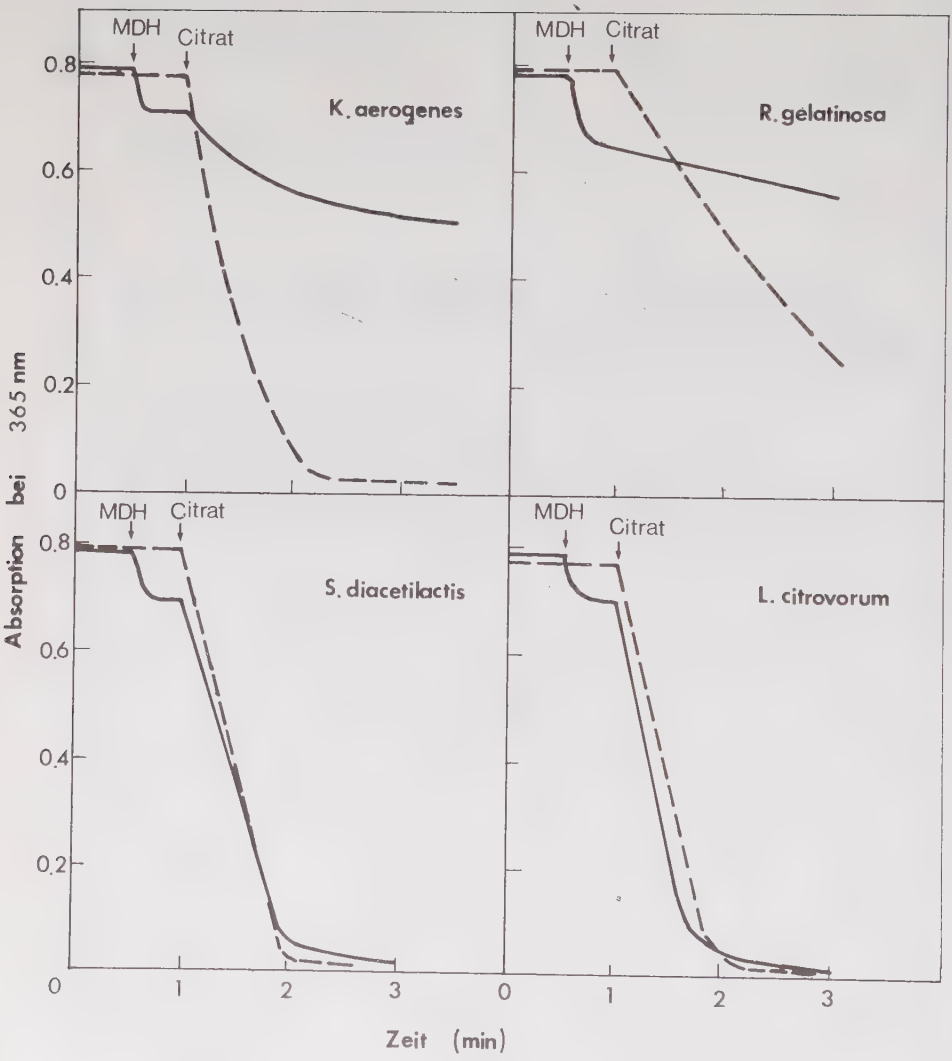

MDH
Citrat
K. aerogenes
R. gelatinosa
S. diacetilactis
L. citrovorum
Absorption bei 365 nm
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
2
3
Zeit (min)

Abb. 14: Einfluß der Vorinkubation mit Oxalacetat auf die Aktivität der vier Citrat-Lyasen

2 E CL wurden in 0,5 ml 50 mM Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 7.4 inkubiert, der 0,5 mM Oxalacetat und 0,5 mM $MgCl_2$ enthielt. Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur für 10 min. 0,05 ml dieser Lösung wurden in einen Testansatz von 0,9 ml gegeben, der 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, 2 mM $MgCl_2$ und 0,3 mM $NADH_2$ enthielt. 10 µg MDH wurden zugefügt. Nach vollständiger Reduktion des Oxalacetats wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml 0,1 M K-Citrat gestartet.
Gestrichelte Linie: Kontrolle (Präinkubation ohne Oxalacetat)
Versuche mit *R. gelatinosa* wurden mit 1 E Enzym durchgeführt.

nachgewiesen werden, daß die vier Lyasen in Abwesenheit von Citrat stabil waren.

Unterschiede im Verhalten der Lyasen in Bezug auf die Inaktivierung mit Oxalacetat konnten ermittelt werden (Abb. 14). Zwei Einheiten Enzym wurden 10 min in Puffer mit 0,5 mM Oxalacetat inkubiert. Anschließend wurde das Oxalacetat zu Malat reduziert und die Lyasereaktion durch Zusatz von Citrat gestartet. Die Enzyme von *K. aerogenes* und *R. gelatinosa* wurden zu einem hohen Prozentsatz inaktiviert, während die Lyasen von *S. diacetilactis* und *L. citrovorum* durch diese Behandlung unbeeinträchtigt blieben.

Um eine eventuelle Reaktionsinaktivierung bei dem Enzym von *S. diacetilactis* nachzuweisen, wurden weitere Versuche unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt und die Anfangsgeschwindigkeit nach der ersten und zweiten Citratzugabe bestimmt. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie zu Abb. 13 angegeben. In Kontrollversuchen wurde die CL im Testansatz ohne Citrat so lange inkubiert, wie die gesamte Citratinkubation dauerte. Danach erfolgte die Zugabe von Citrat und die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Inaktivierungsversuche wurden im Unterschied zu den sonstigen Testansätzen mit Tris-Puffer durchgeführt, da sich das Enzym in diesem Puffer am labilsten gezeigt hatte. Die Reaktionsinaktivierung war vergleichbar gering. Sie wurde verstärkt, wenn DTE und Jodacetat hinzugefügt worden waren. In der Gegenwart von Jodacetat wurden nahezu ein Drittel des aktiven Enzyms durch die Reaktion mit Citrat inaktiviert. Unter allen Reaktionsbedingungen in Tab. 9 waren im Vergleich dazu die Lyasen von *R. gelatinosa* und *K. aerogenes* zu 100% inaktiviert worden.

Tab. 9: Versuche zur Erhöhung der Reaktionsinaktivierung bei der Citrat-Lyase von *Streptococcus diacetilactis*

Inkubationsbedingungen	Enzymaktivität	
	1. Zugabe von Citrat	2. Zugabe von Citrat
	ΔE_{365}/min	ΔE_{365}/min
pH 7,2	0.089	0.080
	-	0.090
pH 8,0	0.078	0.066
	-	0.073
pH 9,2	0.045	0.028
	-	0.027
pH 7,2; 1 mM DTE	0.064	0.044
	-	0.060
pH 7,2; 2 mM Harnstoff	0.047	0.037
	-	0.045
pH 7,2; 10 mM Jodacetat	0.053	0.036
	-	0.054
pH 7,2; 0.05 mM ATP	0.085	0.064
	-	0.084
pH 7,2; 0.05 mM ADP	0.084	0.064
	-	0.084

Testansatz siehe Legende zu Abb. 13.
Die $MgCl_2$-Konzentration betrug 0,2 mM. Kontrollen für jede Untersuchung wurden durchgeführt, indem die Cl im Testansatz ohne Citrat für die Zeit inkubiert wurde, bei der nach Zugabe der zweiten Citratmenge der Reaktionsablauf erfolgte (gewöhnlich : 30 min). Die Kontrollen gaben Auskunft über die Stabilität des Enzyms unter verschiedenen Bedingungen in Abwesenheit von Citrat.

2.4.3. Bestimmung des K_m-Wertes für Citrat

Erst die Analyse des Verlaufs von Substrat-Sättigungskurven hat oftmals wichtige Informationen über die Beziehung von Struktur zur Funktion von Enzymen gegeben. So führten zum Beispiel die Untersuchungen über den hyperbolischen Verlauf der Auftragung von Anfangsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion gegen die Substrat-Konzentration zu dem Konzept des Enzym-Substrat-Komplexes (MICHAELIS und MENTEN, 1913). Die Beobachtungen von sigmoidal-verlaufenden Sättigungskurven ließ die Gegenwart von kooperativen Effekten vermuten (BOHR, 1903). Die Interpretation der kooperativen Effekte als Wechselwirkung zwischen Proteinuntereinheiten ließ mehrere Modelle entstehen (MONOD et al., 1965; KOSHLAND et al., 1966), bei denen die Struktur der Untereinheiten zur Enzymfunktion in Beziehung gesetzt wurde. Eines dieser Modelle (KOSHLAND et al., 1966) führte zur Hypothese der negativen Kooperativität, einer Wechselwirkung zwischen Untereinheiten, bei der die Bindung des ersten Substratmoleküls eine Konformationsänderung dahingehend bewirkt, daß die Bindung des nächsten Moleküls an der zweiten Untereinheit erschwert wird. Die Theorie konnte experimentell bewiesen werden (CONWAY und KOSHLAND, 1968).

Das abweichende kinetische Verhalten einer geringen Anzahl von Enzymen, die innerhalb ihrer Sättigungskurven eine Zwischen-Plateau-Region aufwiesen, war durch Bestimmung katalytischer und Bindungsparameter von TEIPEL und KOSHLAND (1969) untersucht worden. Da bei der Citrat-Lyase von *L. citrovorum* das Phänomen der Zwischen-Plateau-Region aufgetreten war (KÜMMEL, 1973), konnte diese Erscheinung für die Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* ebenfalls vermutet werden. Dies war auch tatsächlich der Fall. Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Citrat-Konzentration ergab bei niedrigen Substratkonzentrationen einen hyperbolischen Verlauf. Der Übergang vom hyperbolischen zum sigmoiden Verlauf bei höheren Substratkonzentrationen führte zu einer sogenannten "bumpy curve".

Die Maxima und Minima innerhalb der Sättigungskurve traten bei unterschiedlicher Enzymkonzentration bei gleichen Substratkonzentrationen auf; bei höheren Enzymkonzentrationen waren sie ausgeprägter (Abb. 15). Durch Erhöhung der Mg-Konzentration und durch Veränderung der Ionenkonzentration durch Zusatz von KCl, was eine Konformationsänderung bewirken sollte, wurde der Verlauf der Kurve nicht verändert. Um auszuschließen, daß die aufgetretenen Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik innerhalb der Fehlerbreite des angewendeten Tests lagen, wurden die Versuche mehrmals wiederholt und der mittlere Fehler für jeden einzelnen Punkt bestimmt. In Tab. 10 ist der Mittelwert der Geschwindigkeit v (ΔE/min) von jedem Punkt der Kurve aus Versuchen angegeben, sowie die Berechnung des mittleren Fehlers pro Punkt. Die gestrichelte Linie in Abb. 15 gibt die graphische Darstellung des Mittelwertes wieder. Damit war bewiesen, daß der kurvige Verlauf außerhalb der Fehlerbreite lag.

Auch in einer LINEWEAVER-BURK-Auftragung (1/v gegen 1/s) kam die beobachtete Abweichung von der Michaelis-Menten-Kinetik zum Ausdruck (Abb. 16). Die Auftragung ergab keinen geraden, sondern einen kurvigen Verlauf. Bei Vernachlässigung dieser Abweichungen ließ sich ein gemittelter Km-Wert von 3.07×10^{-4} ablesen.

TEIPEL und KOSHLAND (1969) wiesen nach, daß nur Enzyme, die mehr als zwei Substratbindungsstellen besitzen, eine Zwischen-Plateau-Region innerhalb einer Sättigungskurve zeigen können, und zwar nur dann, wenn die relative Größe der katalytischen oder Bindungskonstanten zuerst abnahm und dann zunahm, wenn das Enzym gesättigt vorlag. Es war nicht der Fall, wenn die relative Größe fortschreitend zunahm, abnahm oder konstant war.

Da in Bindungsstudien der Hill-Koeffizient theoretisch die Mindestanzahl der Substratbindungsstellen angeben kann, wurde eine Hill-Auftragung durchgeführt (Abb. 17). Substratsättigungskurven mit $n_H > 1$ entsprechen positiver, Substratsätti-

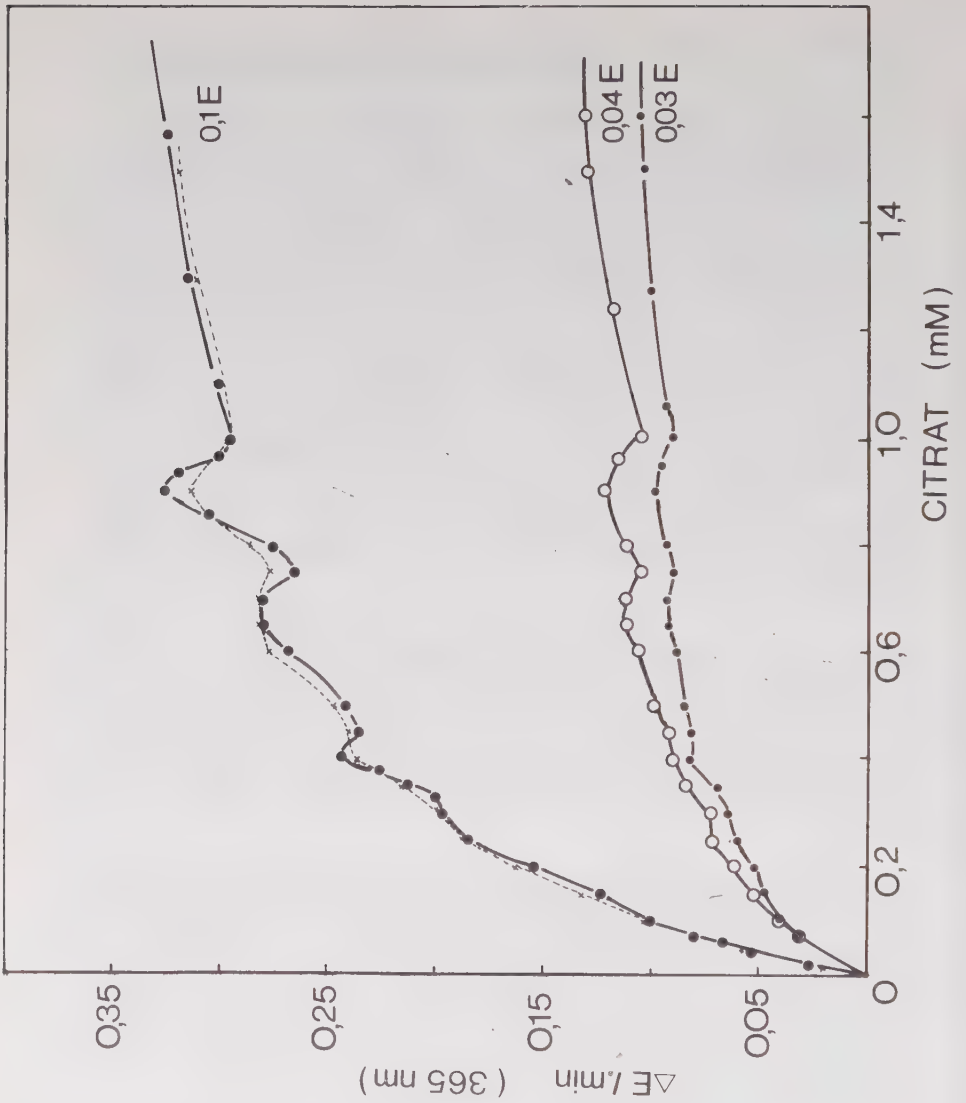


Abb. 15: Substratsättigungskurve für Citrat im Bereich von 0 - 1.6 mM Substrat

Der Reaktionsansatz ist unter METHODEN angegeben. Der Test wurde in Gegenwart von 2 mM $MgCl_2$ und variierenden Citratmengen (0 - 20 mM) durchgeführt. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert aus vier verschiedenen Versuchen wieder.

Die Maxima und Minima innerhalb der Sättigungskurve traten bei unterschiedlicher Enzymkonzentration bei gleichen Substratkonzentrationen auf; bei höheren Enzymkonzentrationen waren sie ausgeprägter (Abb. 15). Durch Erhöhung der Mg-Konzentration und durch Veränderung der Ionenkonzentration durch Zusatz von KCl, was eine Konformationsänderung bewirken sollte, wurde der Verlauf der Kurve nicht verändert. Um auszuschließen, daß die aufgetretenen Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik innerhalb der Fehlerbreite des angewendeten Tests lagen, wurden die Versuche mehrmals wiederholt und der mittlere Fehler für jeden einzelnen Punkt bestimmt. In Tab. 10 ist der Mittelwert der Geschwindigkeit v (ΔE/min) von jedem Punkt der Kurve aus Versuchen angegeben, sowie die Berechnung des mittleren Fehlers pro Punkt. Die gestrichelte Linie in Abb. 15 gibt die graphische Darstellung des Mittelwertes wieder. Damit war bewiesen, daß der kurvige Verlauf außerhalb der Fehlerbreite lag.

Auch in einer LINEWEAVER-BURK-Auftragung (1/v gegen 1/s) kam die beobachtete Abweichung von der Michaelis-Menten-Kinetik zum Ausdruck (Abb. 16). Die Auftragung ergab keinen geraden, sondern einen kurvigen Verlauf. Bei Vernachlässigung dieser Abweichungen ließ sich ein gemittelter Km-Wert von 3.07×10^{-4} ablesen.

TEIPEL und KOSHLAND (1969) wiesen nach, daß nur Enzyme, die mehr als zwei Substratbindungsstellen besitzen, eine Zwischen-Plateau-Region innerhalb einer Sättigungskurve zeigen können, und zwar nur dann, wenn die relative Größe der katalytischen oder Bindungskonstanten zuerst abnahm und dann zunahm, wenn das Enzym gesättigt vorlag. Es war nicht der Fall, wenn die relative Größe fortschreitend zunahm, abnahm oder konstant war.

Da in Bindungsstudien der Hill-Koeffizient theoretisch die Mindestanzahl der Substratbindungsstellen angeben kann, wurde eine Hill-Auftragung durchgeführt (Abb. 17). Substratsättigungskurven mit $n_H > 1$ entsprechen positiver, Substratsätti-

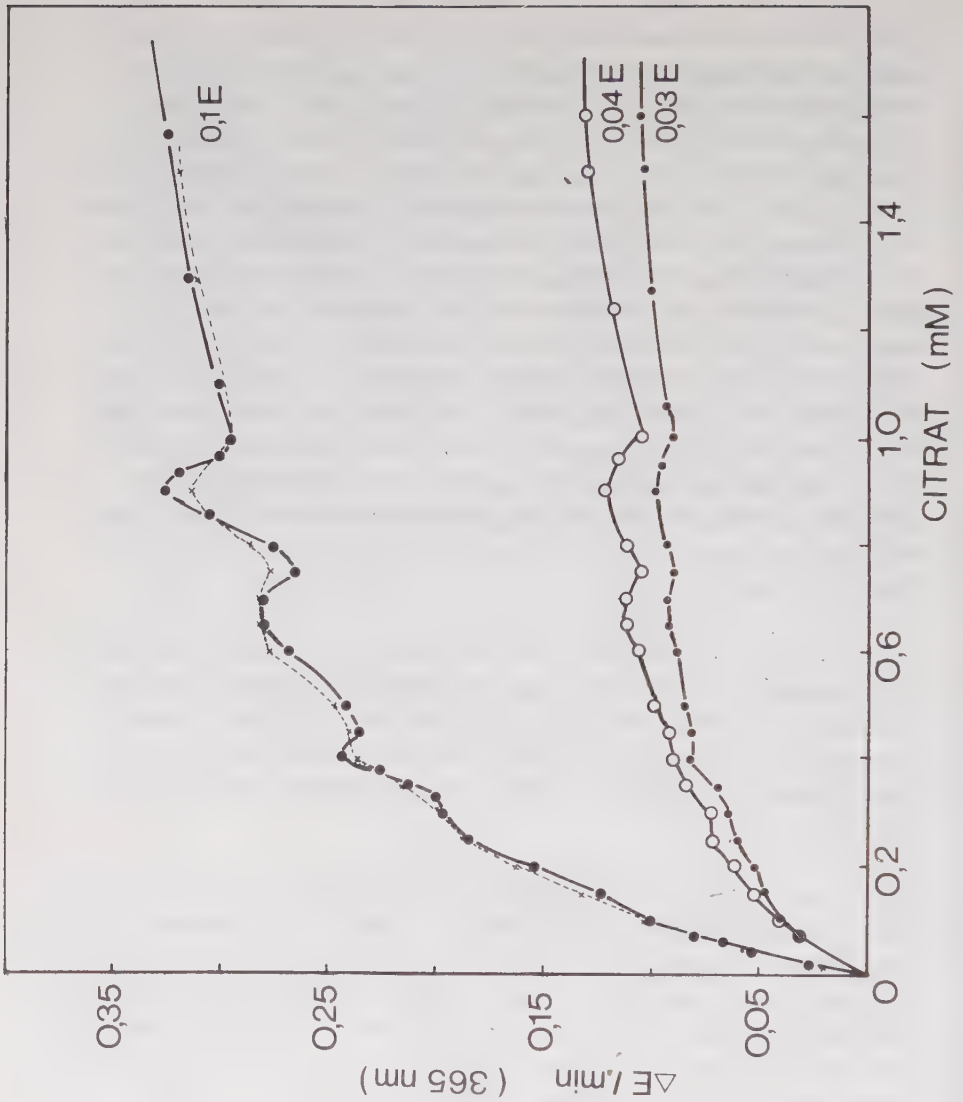


Abb. 15: Substratsättigungskurve für Citrat im Bereich von 0 - 1.6 mM Substrat

Der Reaktionsansatz ist unter METHODEN angegeben. Der Test wurde in Gegenwart von 2 mM $MgCl_2$ und variierenden Citratmengen (0 - 20 mM) durchgeführt. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert aus vier verschiedenen Versuchen wieder.

Tab. 10: Berechnung des mittleren Fehlers für jeden Punkt der Substratsättigungskurve

S (mM)	$\bar{V}$ (Mittelwert aus v_1, v_2, v_3, v_4) ΔE_{365} /min	Mittlerer Fehler für v_1, v_2, v_3, v_4
20	0.325	0.011
10	0.321	0.018
8	0.337	0.004
6	0.343	0.008
5	0.347	0.005
4.5	0.337	0.011
4	0.332	0.014
3	0.348	0.016
2	0.338	0.008
2.5	0.334	0.004
1.0	0.296	0.006
0.9	0.313	0.02
0.8	0.285	0.011
0.75	0.276	0.013
0.7	0.282	0.004
0.65	0.281	0.001
0.6	0.276	0.007
0.5	0.247	0.005
0.45	0.239	0.003
0.4	0.236	0.009
0.35	0.214	0.005
0.3	0.197	0.006
0.25	0.185	0.004
0.2	0.161	0.01
0.15	0.130	0.005
0.1	0.103	0.009
0.075	0.078	0.002
0.06	0.069	0.002
0.05	0.057	0.002
0.04	0.053	0.002
0.02	0.025	0.001

Aus 4 Einzelmessungen bildet man den Mittelwert

$$\bar{v} = \frac{v_1 + v_2 + v_3 + v_4}{n} = \frac{1}{n} \sum_{r=1}^{n} v_r$$

Danach berechnet man (ε_r) die Fehler der einzelnen Beobachtungen, d.h. die Abweichung der einzelnen Beobachtungen vom Mittelwert. ($\varepsilon_r = v_r - \bar{v}$). Um den mittleren Fehler berechnen zu können, quadriert man die Einzelfehler, bildet dann den Mittelwert aus diesen Quadratenund zieht schließlich die Quadratwurzel aus diesem Mittelwert. Diesen nennt man den mittleren Fehler der Einzelmessung oder auch das quadratische Streuungsmaß (fm = $\sqrt{\varepsilon^2}$)

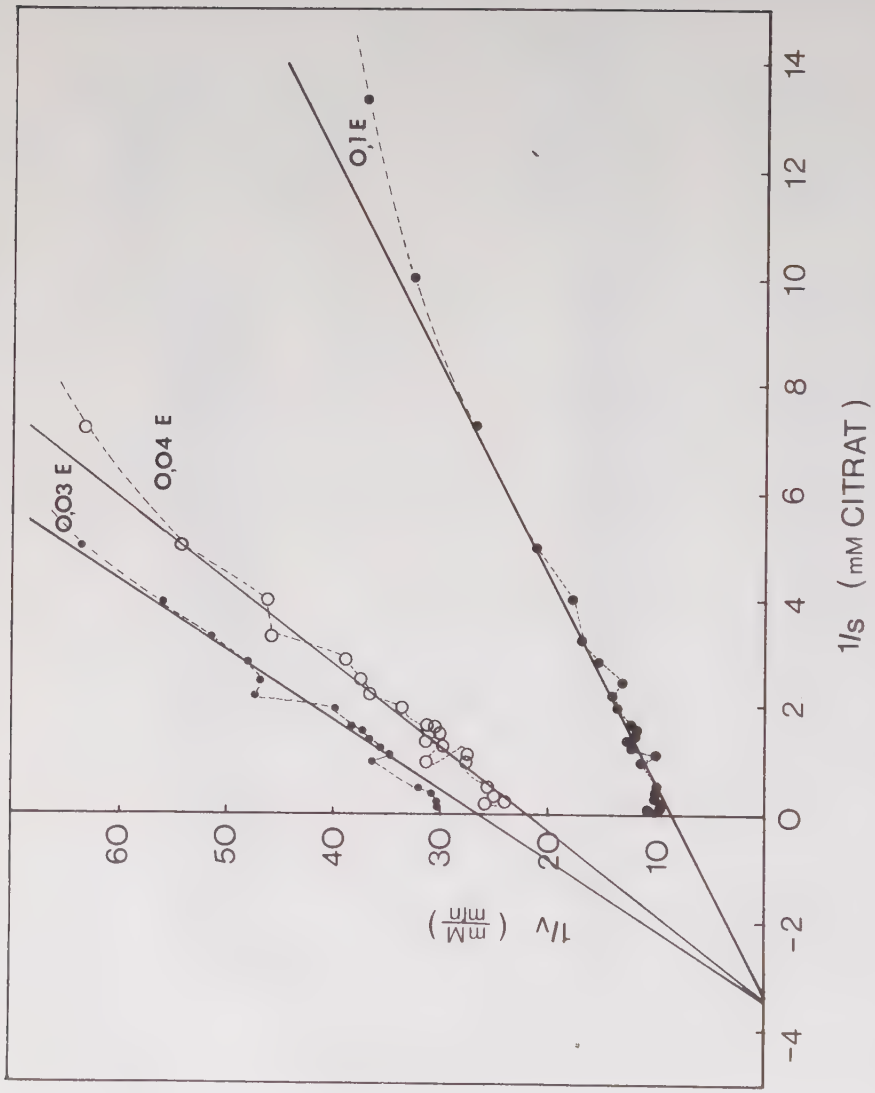


Abb. 16: LINEWEAVER-BURK-Auftragung zu Abb. 15

-•-•- 0.03 E
-○-○- 0.04 E
-•-•- 0.1 E

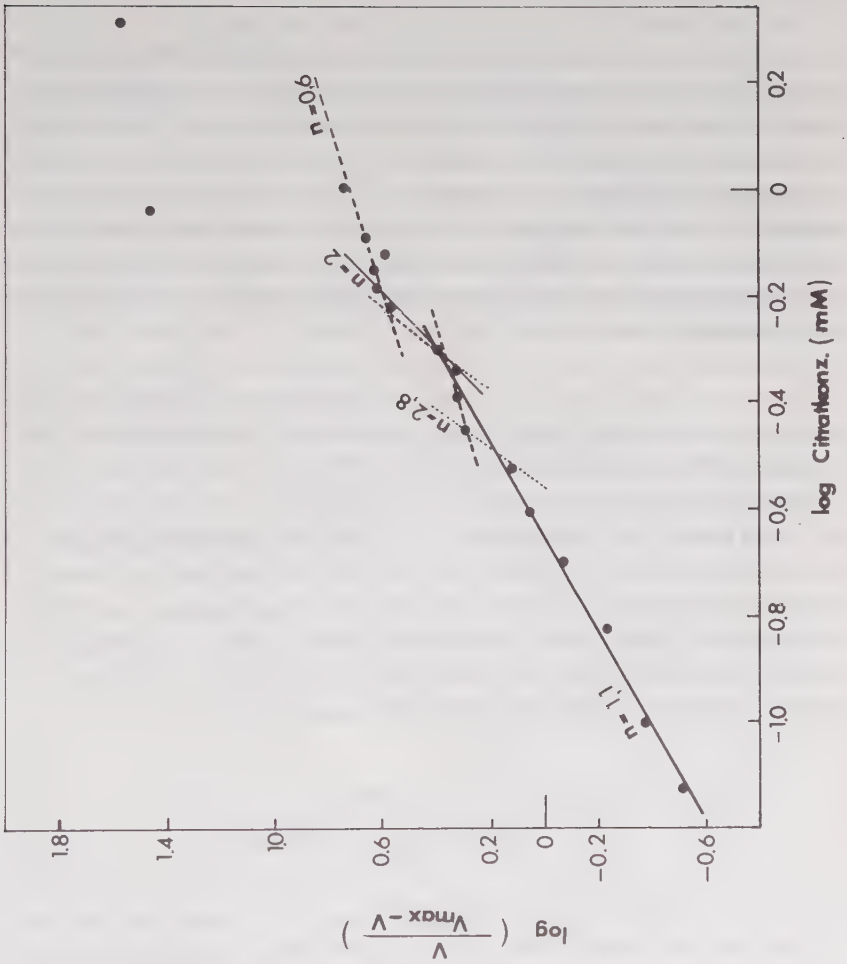


Abb. 17: Hill-Auftragung zu Abb. 15

gungskurven mit $n_H < 1$ negativer Kooperativität, während $n_H = 1$ keine Wechselbeziehung zwischen den Stellen bedeutet (LEVITZKI und KOSHLAND, 1969).

In der Hill-Auftragung ergab sich keine einheitliche Gerade. Für geringe Substratkonzentrationen (0.075-0.5 mM) konnte ein Hill-Koeffizient von $n_H = 1,1$ für mittlere (0,5-1,0 mM) konnten mehrere Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,6-2,8$ und für hohe Citratkonzentrationen (> 1,0 mM) $n_H = 1,1$ oder 2,8 ermittelt werden. Unter der Annahme einer substratinduzierten Konformationsumwandlung konnten danach positive und negative kooperative Effekte bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß wenigstens drei Bindungsstellen für Citrat vorhanden sind (Interpretation der Ergebnisse vgl. Diskussion).

Die Bestimmung des R_s-Wertes, d. h. dem Quotienten aus der Substratkonzentration für 90% und für 10% der Maximalgeschwindigkeit, sollte ein weiteres Hilfsmittel zur Analyse der Wechselwirkungen sein. Dabei entspricht ein R_s-Wert = 81 einer Michaelis-Menten-Kinetik, ein R_s-Wert < 81 einer positiven und ein R_s-Wert > 81 einer negativen Kooperativität.

$$R_s = \frac{(S)_{90\%}\ v_{max}}{(S)_{10\%}\ v_{max}}$$

Aus Abb. 15 ergab sich ein R_s-Wert von 59,8, wenn auf 1,6 mM Citrat bezogen wurde. Der hohe R_s-Wert deutet auf eine positive Kooperativität hin. Da aber Auswirkungen des mittleren Bereiches der Substratsättigungskurve, für die negative Kooperativität nachgewiesen worden war, in dieser Berechnung nicht berücksichtigt werden können, kann trotz niedrigem R_s-Wert negative Kooperativität bestehen. Die Berechnung kann demnach in diesem Fall nur belegen, daß überhaupt eine Kooperativität besteht.

Welche Möglichkeiten der Interpretation der erhaltenen Substratsättigungskurven bestehen, werden in der Diskussion erörtert werden, da positive und negative Kooperativität nicht nur durch Konformationsumwandlungen mit einer Änderung der Affinität der substratbindenden Zentren erklärt werden können, sondern auch durch andere Modelle (AINSLE et al., 1972; FRIEDEN, 1970), wie den "slow isomerization mechanism", indem ein zeitabhängiger Schritt apparente Kooperativität hervorruft. Untersuchungen über verschiedene Kombinationen von Geschwindigkeitskonstanten haben die Abhängigkeit des kooperativen Systems vom Wechsel in bestimmten Geschwindigkeitskonstanten gezeigt. Für die Kooperativität mußte in diesem Modell die Bedingung erfüllt sein, daß sich sowohl der Bindungs- als auch der Isomerisierungsschritt im "steady state" und nicht im Gleichgewicht befand.

Ein Zusammenwirken oder Überdecken von mehreren Modellen wäre ebenfalls denkbar. Eine exakte Erklärung wäre nur durch weitere Bindungsstudien möglich.

III. Nachweis und Anreicherung eines acetylierenden Enzyms der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis*

Aktive Citrat-Lyase aus *K. aerogenes* wurde während der durch sie katalysierten Reaktion inaktiviert. Diese Inaktivierung war mit einer Desacetylierung verknüpft. BUCKEL et al. (1971) wiesen nach, daß die Acetylgruppe am Enzym als Thioester fungiert, was SRERE et al. (1972) durch Versuche mit SH-Gruppen blockierenden Verbindungen bestätigten. Während die Abspaltung des kovalent gebundenen Acetylrestes in vitro auf rein chemischem Weg durch die Acyl-Austausch-Reaktion erfolgt, handelt es sich bei der Desacetylierung der CL aus *R. gelatinosa* in vivo und in vitro um eine enzymkatalysierte Reaktion (GIFFHORN et al., 1975b).

Es galt, ein Enzym nachzuweisen, welches die Acetylierung in vivo katalysiert, da angenommen wurde, daß de-novo ein HS-Enzym gebildet wird, daß durch ein acetylierendes Enzym in das aktive Acetyl-S-Enzym umgewandelt wird.

Aufgrund der Stabilität der CL aus *S. diacetilactis* und des Fehlens einer ausgeprägten Reaktionsinaktivierung schien diese Citrat-Lyase günstige Voraussetzungen zu bieten, Nachforschungen über ein acetylierendes Enzym anzustellen.

3.1. Herstellung von desacetylierter Citrat-Lyase

Um eine enzymatische Reaktivierung messen zu können, mußte zuerst das Substrat, eine desacetylierte Citrat-Lyase, hergestellt werden. BUCKEL et al. (1973) hatten zwei mögliche Formen inaktiver Citrat-Lyase nachgewiesen. Eine Form, das SH-Enzym, war wieder acetylierbar, die andere Form, das mit Jodacetat carboxymethylierte Enzym = Enzym - $S\text{-}CH_2CO_2H$, blieb inaktiv. Eine schonende Methode zur Herstellung inaktiver CL, die wieder acetylierbar war, mußte erarbeitet werden.

Eine Inaktivierung mit Citrat oder Oxalacetat oder in Abwesenheit von Mg^{2+}-Ionen war bei der Lyase von *S. diacetilactis* nicht möglich, da wie berichtet nur eine minimale Reaktionsinaktivierung zu messen war.
Eine Desacetylierung erfolgte nach Inkubation mit Hydroxylamin. Die anschließende Entfernung des überschüssigen Desacetylierungsmittels durch Dialyse oder Acetylphosphat und anschließende Reduktion der oxidierten SH-Gruppen erbrachte eine geringe Ausbeute und war zeitaufwendig. (Eine Transacetylierung mit CoA war effektiv, da jedoch Acetyl-CoA als eventuelles Substrat des acetylierenden Enzyms galt, wurde diese Methode ausgeschlossen.)

SINGH et al. (1971) hatten für die CL aus *K. aerogenes* beschrieben, daß das Enzym den aktiven Acetylrest bei hoher SH-Reagenz-Konzentration verlor, wobei freie SH-Gruppen als Acceptoren fungierten. Die spontane Hydrolyse von Thioestern, die im alkalischen pH-Bereich am wirkungsvollsten ist, wurde in die Überlegung mit einbezogen.

3.1.1. Verwendete Puffersysteme und Stabilitätsprüfung der inaktiven Citrat-Lyase

Tris/Acetat-Puffer, pH 8,6

Die Labilität der Citrat-Lyase im alkalischen Bereich wurde für die Inaktivierung ausgenutzt. Im verwendeten Tris/Acetat-Puffer, pH 8,6, war die Cl in Gegenwart von 3 mM DTE innerhalb von 45 min bei 30° C vollständig desacetyliert worden. Zur Ansäuerung auf pH 6,4 wurde 2,4 N Essigsäure verwendet. Eine Reaktivierung mit Acetyl-Imidazol ließ die CL-Aktivität um 15 % gegenüber dem Anfangswert ansteigen, wodurch eine teilweise Oxidation der eingesetzten CL angezeigt wurde. Es wurde zwar eine vollständige Inaktivierung in Tris-Puffer erzielt, jedoch verlor das inaktive Enzym innerhalb von 24 Stun-

den bei Aufbewahrung bei -20° C 23%, bei 4° C 29% an Aktivität, wenn es chemisch acetyliert wurde.

KPO_4-Puffer, pH 7,8

Außer der Inaktivierung des aktiven Enzyms war zur Durchführung der Reaktivierungsversuche eine hinreichende Stabilität des inaktiven Enzympräparates wichtig. Eine Inaktivierung im alkalischen Bereich hatte sich als erfolgreich erwiesen, am stabilsten war die aktive Citrat-Lyase in KPO_4-Puffer gewesen. Es wurde versucht, die getrennt erfüllten Bedingungen im folgenden Test zu verknüpfen.
Mit einer schwach puffernden KPO_4-Lösung, pH 8,2 wurde die Enzymsuspension (pH 6,2) auf eine Aktivität von 10-20 E/ml verdünnt und der pH somit auf 7,8 angehoben. Inaktivierung mit 4.2 mM DTE bei 30° C erfolgte innerhalb von 60 min. Die Ansäuerung mit Essigsäure auf den Ausgangswert der Enzymlösung von pH 6,2 brachte keinen Aktivitätsverlust. Die chemische Reaktivierung mit Acetyl-Imidazol erhöhte die Ausgangsaktivität teilweise bis zu 30%. Die Methode der Inaktivierung schien akzeptabel; bei Prüfung auf Stabilität der inaktiven CL wurde jedoch beobachtet, daß die Lyase bei Aufbewahrung bei 4° C langsam reaktiviert wurde, ohne daß chemisch acetyliert worden war. Nach 24 Stunden waren 25%, nach 5 Tagen 55% reaktiviert. Wurde nach Inaktivierung mit Phosphorsäure anstelle von Essigsäure angesäuert, blieb das Enzym inaktiv. Die Aktivität wurde mit Acetyl-Imidazol überprüft. Nach anfänglichem Aktivitätsverlust von 13% blieb das Enzym über Wochen (Monate) stabil, bei Aufbewahrung bei 4° C in relativ verdünntem Zustand.

Wurde die Lyase mit 6 mM DTE bei pH 6,2 über 5 Stunden bei 30° C inkubiert, so verlor das Enzym 80% an Aktivität. Anschließende Aufbewahrung bei 4° C über 8-12 Tage ließ die Aktivität bis auf 3% zurückgehen. Diese schonende Methode der Inaktivierung wurde teilweise angewendet. Je langsamer die

Desacetylierung erfolgte, umso höher war die Aktivität, die nach chemischer Acetylierung erreicht wurde. Sie lag bis zu 50% höher als der Ausgangswert des aktiven Enzyms.

3.1.2. Inaktivierungsdauer in Abhängigkeit von DTE-Konzentration, Reinheitsgrad und Alter der CL

Hohe Konzentrationen von DTE (10 mM) beschleunigten die Inaktivierungsgeschwindigkeit (Abb. 18). Trotzdem mußten niedrige Konzentrationen (4 mM) zur Inaktivierung verwendet werden, da nicht die chemische, wohl aber die enzymatische Reaktivierung durch überschüssiges Reduktionsmittel negativ beeinflußt wurde, wie im nächsten Kapitel erläutert wird.

Die Inaktivierungsdauer war ebenfalls abhängig vom Reinheitsgrad der Citrat-Lyase. Wurden Proben innerhalb einer Anreicherung von jedem Reinigungsschritt genommen und inaktiviert, so verringerte sich vom Rohextrakt bis zum angereicherten Enzym die Inaktivierungszeit von 90 auf 40 min. Je mehr die CL während der Anreicherung partiell denaturiert worden war und je älter das Enzym wurde, desto höher lag die Inaktivierungszeit bei gleicher DTE-Konzentration.

3.2. Chemische Acetylierung

Zur chemischen Modifizierung von Proteinen kann die Acetylierung von Aminogruppen verwendet werden. Die nicht spezifisch verlaufende Acetylierung liegt darin begründet, daß die Aminogruppen meist an der Oberfläche der dreidimensionalen Struktur des Proteins liegen, mit der Umgebung in Kontakt treten können und dementsprechend durch chemische Mittel leicht angreifbar sind (RIORDAN und VALLEE, 1962). Eine chemische Acetylierung inaktiver Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* durch Acetyl-Imidazol oder Acetanhydrid war möglich. Sie war

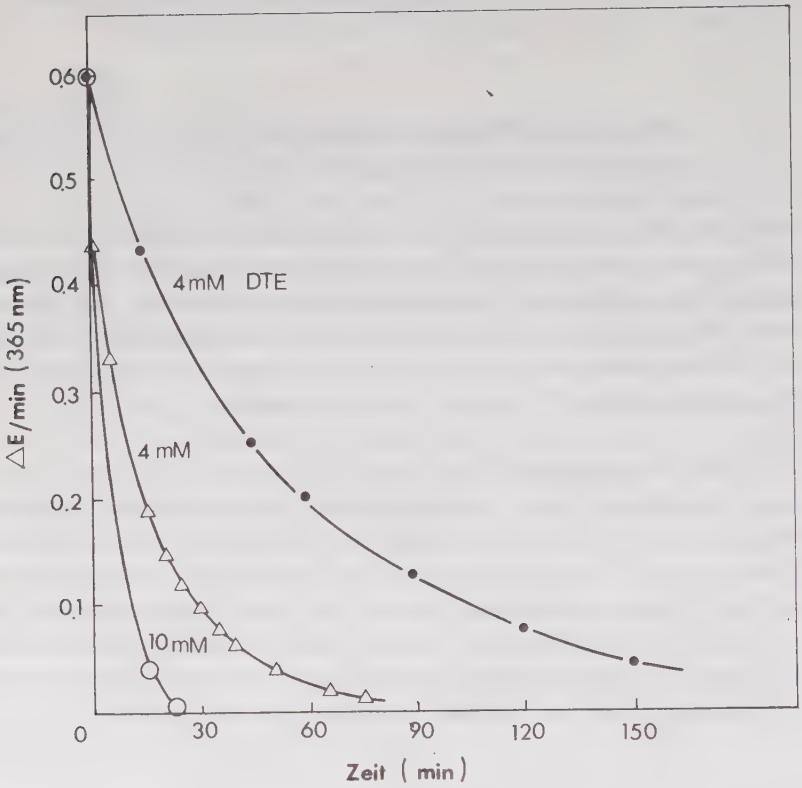


Abb. 18: Inaktivierung der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* in Abhängigkeit von DTE-Konzentration und Alter

Die Inkubation erfolgte in KPO_4-Puffer, pH 7,8 wie unter METHODEN angegeben. Die Ansätze enthielten 20 oder 13 E/mg Protein in einem Volumen von 1 ml.

—●—●— 4 mM DTE 20 E/mg 4 Wochen alt

—△—△— 4 mM DTE 13 E/mg 2 Tage alt

—○—○— 10 mM DTE 20 E/mg 4 Wochen alt

Voraussetzung für die Bestimmung der Aktivität inaktiver Citrat-Lyase und damit Bezugspunkt der eingesetzten inaktiven CL-Einheiten im Inkubationsansatz zur Messung der enzymatischen Aktivität. Eine vollständige chemische Acetylierung der reduzierten Stellen erfolgte nicht, was sich in höheren Werten der enzymatischen Acetylierung ausdrückte (Tab. 13 + 17).
In Tab. 11 sind die Ergebnisse zusammengefaßt, die zur Ermittlung der optimalen Acetylierungskonzentration und -zeit durchgeführt worden waren. Demnach wurde das Maximum nach 5 min erreicht.
Die anschließende geringfügige Abnahme war in einem Acetylaustausch zu sehen. Höhere Konzentrationen schienen keinen negativen Einfluß zu haben.

Tab. 11: Ermittlung der optimalen Konzentration an Acetyl-Imidazol und der Inkubationszeit zur Reaktivierung inaktiver CL

Zeit (min)	Acetyl-Imidazol (mM)	Aktivität (E/ml)
0	-	0.003
1	10	17.57
3	10	25.5
5	10	33.03
10	10	28.8
12	10	28.4
15	10	30.0
1	14	20.2
5	14	28.48
5	6	29.5

Der Testansatz ist unter METHODEN angegeben.

Wie bereits erwähnt, war der Grad der Acetylierung abhängig von der Anzahl der reduzierten Stellen. Im Durchschnitt lag

der durch chemische Acetylierung erzielte Wert der inaktiven CL um 20% höher als der des nativen aktiven Enzyms, er konnte aber bis zu 70% ausmachen. Der durch enzymatische Acetylierung erzielte Wert lag noch um 15-30% höher als der durch chemische Acetylierung erreichte Wert.

3.3. Enzymatische Reaktivierung desacetylierter Citrat-Lyase

3.3.1. Acetyl-CoA-abhängige Reaktivierung

In der Vermutung, daß Acetyl-CoA als Substrat eines eventuell vorhandenen acetylierenden Enzyms fungieren würde, wurde 1 E inaktive Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* in KPO_4-Puffer, pH 7,2 mit 2 mM $MgCl_2$, 1 mM Acetyl-CoA und 10 µl Rohextrakt in einem Volumen von 0.5 ml bei 25° C inkubiert. Bei dem zum Inkubationsansatz zugesetzten Acetyl-CoA handelte es sich um Präparationen, die keiner weiteren Reinigung unterzogen worden waren.
In periodischen Abständen wurden Proben entnommen und im normalen CL-Testansatz die Citrat-Lyase-Aktivität bestimmt. Eine Reaktivierung war innerhalb von 80 min meßbar, wie aus Abb. 19 zu ersehen ist.
Acetyl-CoA schien das Substrat zu sein und das acetylierende Enzym als Acetyl-Transferase zu fungieren. Aus Ansätzen ohne Rohextrakt wurden die Werte für die spontane Acetylierung, die auf Umacetylierung in Gegenwart der hohen Acetyl-CoA-Konzentration beruhte, ermittelt. Im Durchschnitt betrug die spontane Acetylierung 25% von der enzymatischen. Sie wurde von der gemessenen Reaktivierung abgezogen sowie die durch den Rohextrakt bedingte minimale CL-Aktivität.

Bevor der Test optimiert wurde, sollte in orientierenden Versuchen eine teilweise Anreicherung erzielt werden. Eine Fällung bis zu 70% mit Ammoniumsulfat brachte keine Trennung der Citrat-Lyase von der acetylierenden Aktivität, erst eine Gel-

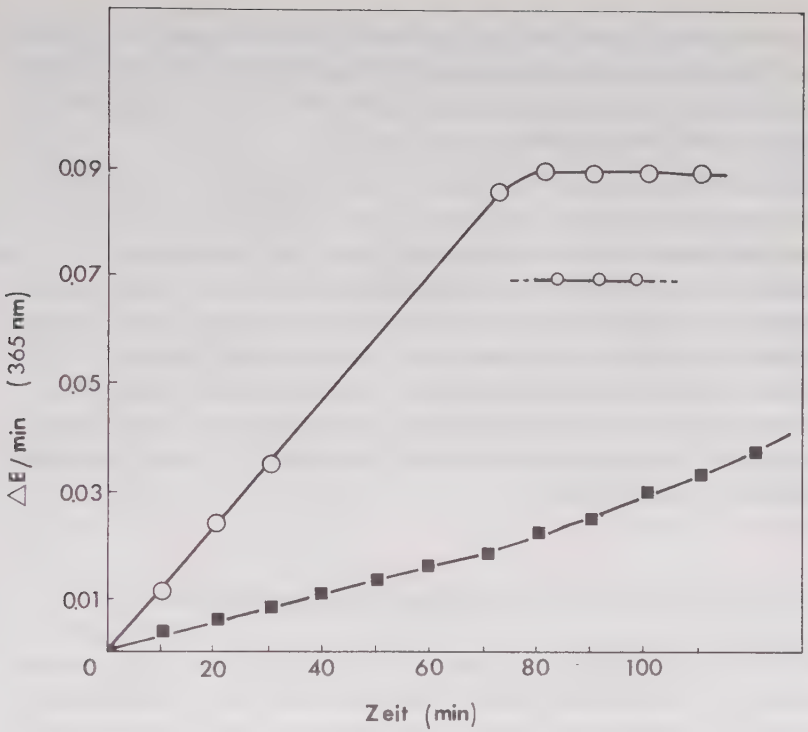


Abb. 19: Acetyl-CoA-abhängige Reaktivierung inaktiver Citrat-Lyase

Der Testansatz ist unter METHODEN angegeben. 10 µl Enzym wurden eingesetzt. Die spontane Acetylierung durch Acetyl-CoA, die in Abwesenheit des Rohextraktes ermittelt wurde, wurde in der Auftragung nicht abgezogen, sowie die minimale Aktivität des Rohextraktes.

—○—○— Enzymatische Reaktivierung von inaktiver CL mit AcCoA + Rohextrakt

—■—■— Spontane Acetylierung von inaktiver CL + AcCoA - Rohextrakt

- - ○ - - ○ - - Chemische Acetylierung mit Acetyl-Imidazol

filtration an Sepharose-6B schien eine Separation zu begünstigen. Der Extrakt mit der acetylierenden Aktivität, der nach dem CL-Peak aufgefangen wurde, wurde für die weiteren Tests anstelle des Rohextraktes eingesetzt.

Eine Aktivierung der inaktiven Citrat-Lyase mit Extrakt in Abwesenheit von Acetyl-CoA wurde nicht gemessen. Die Reaktivierungsgeschwindigkeit war abhängig von der eingesetzten Extraktmenge. Bei konstanter Extraktmenge und Erhöhung der Einheiten inaktiver Citrat-Lyase konnte keine Substratsättigung erzielt werden. Bei Einsatz von mehr als 3 Einheiten inaktiver Citrat-Lyase war die Reaktivierung nicht mehr linear, sondern die Geschwindigkeit nahm nach 30 min mit zunehmender Inkubationsdauer zu. Die lag-Phase ließ auf die Bildung eines Zwischenproduktes schließen.

3.3.2. ATP und Acetat-abhängige Reaktivierung

SINGH et al. (1973) schienen ein acetylierendes Enzym aus *K. aerogenes* isoliert zu haben, welches eine Acetyl-Gruppe vom Acetyl-S-Phosphopantothein auf desacetylierte Citrat-Lyase übertrug. SCHMELLENKAMP und EGGERER (1974) widerlegten jedoch diese Arbeit. Die Autoren reicherten ein die desacetylierte Citrat-Lyase aktivierendes Enzym an, dessen Substrate ATP und Acetat waren und bezeichneten es als Acetat: SH (Acyl-Carrier-Protein) Enzym-Ligase (AMP). SH (Acyl-Carrier-Protein) kennzeichnete in dieser Benennung den Acetyl-Akzeptor, d.h. die Mercaptan-Gruppe eines Cysteamin-Restes des Acyl-Carrier-Proteins (ACP) der Citrat-Lyase. Sie wiesen nach, daß chromatographisch gereinigtes Acetyl-CoA enzymatisch inaktiv war und ungereinigte Acetyl-CoA-Präparationen Spuren von Adeninnukleotiden enthielten.

In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde Acetyl-CoA im Inkubationsansatz der inaktiven Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* mit Extrakt durch ATP und Acetat ersetzt. Die Konzentration

an ATP betrug 0.1 mM, die des Acetats 5 mM im Endvolumen von 0.5 ml. Eine vollständige Reaktivierung erfolgte innerhalb von 15 min ohne lag-Phase. Fehlte eines der Substrate ATP oder Acetat, so unterblieb eine Reaktivierung. Die spontane Acetylierung konnte hierbei vernachlässigt werden, da keine aktivierte Essigsäure vorlag.

Eine vollkommen neue Perspektive ergab sich, als bei Fehlen des angereicherten Extraktes in Anwesenheit von ATP und Acetat die inaktive Citrat-Lyase mit gleicher Geschwindigkeit reaktiviert wurde, wie in Gegenwart des Extraktes. Dieses Ergebnis konnte nur bedeuten, daß sich die acetylierende Aktivität noch im Präparat der angereicherten Lyase befand, die durch die Inkubation mit DTE nicht beeinträchtigt worden war. Die Reaktivierung mit ATP und Acetat war bedeutend schneller als mit Acetyl-CoA (s. Abb. 20).

Das aktive Prinzip des getesteten Extraktes wurde darauf als ein Gemisch von Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase identifiziert. Dieses Ergebnis wurde auf der Grundlage der Ergebnisse von SCHMELLENKAMP und EGGERER (1974) dahingehend erklärt, daß Acetylphosphat aus Acetyl-CoA und Pi durch Einwirkung von PTA entstand, welches durch die Acetat-Kinase und ADP in die Produkte ATP und Acetat überführt wurde.

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{Pi} \xrightleftharpoons{\text{PTA}} \text{Acetylphosphat} + \text{CoA}$$

$$\text{Acetylphosphat} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{Acetat-Kinase}} \text{ATP} + \text{Acetat}$$

3.4. Versuch zur Anreicherung des acetylierenden Enzyms

Aus den vorangegangenen Versuchen schien sich anzudeuten, daß die acetylierende Aktivität im Gegensatz zu *K. aerogenes* bei *S. diacetilactis* eng mit der Citrat-Lyase verknüpft war.

Um das acetylierende Enzym bei *S. diacetilactis* während der Anreicherung der Citrat-Lyase zu testen, wurden Aliquots pro Anreicherungsschritt entnommen. Die Aliquots des Rohextraktes, der CTAB- und der Al C_γ-Fällung wurden zusätzlich durch einen Säulenlauf G 25 von eventuell vorhandenem ATP und Acetat befreit. Die Aliquots wurden wie beschrieben mit DTE inaktiviert, als Bezugspunkt die Einheiten Citrat-Lyase mit Acetyl-Imidazol bestimmt,und pro Anreicherungsschritt wurden 3 E inaktive Citrat-Lyase im Inkubationsansatz mit ATP und Acetat reaktiviert (ausführliche Beschreibung siehe METHODEN).

Aus Tab. 12 ist ersichtlich, daß parallel zur Anreicherung der Citrat-Lyase die spezifische Aktivität des acetylierenden Enzyms zunahm. Die Werte aus Tab. 12 sind in Beziehung gesetzt zu den Werten aus der Anreicherung der Citrat-Lyase (Tab. 5). Die Einheit des acetylierenden Enzyms wurde auf die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktivierung bezogen und aus $\frac{\text{E gebildete aktive CL}}{5\ \text{min}}$ errechnete sich $\frac{\text{E gebildete aktive CL}}{1\ \text{min}}$. Wurde die Aktivität des acetylierenden Enzyms zu 3 Einheiten Citrat-Lyase in Beziehung gesetzt, so erfolgte eine Abnahme der Werte von 0.39 auf 0.26 während der Anreicherung. Demnach waren 70% der acetylierenden Aktivität im Vergleich zum Rohextrakt erhalten geblieben.

Abb. 20 gibt die Kinetiken der Acetylierungsreaktion von Rohextrakt und angereicherten Fraktionen wieder; es wurden jeweils 3 Einheiten inaktive Citrat-Lyase eingesetzt. Eine Abnahme der Reaktivierungsgeschwindigkeit konnte erst nach der ersten Gelfiltration an Sepharose-6B festgestellt werden; nach CTAB- und Al C_γ-Fällung war der Level an acetylierendem Enzym

Tab. 12: Anreicherung der Citrat-Lyase und des acetylierenden Enzyms von *Streptococcus diacetilactis*

Anreicherungsschritt	Volumen (ml)	Citrat-Lyase		Acetylierendes Enzym	
		Spez. Akt. (E/mg)	Ausbeute (%)	Aktivität (E^*/3 E Lyase)	Spez. Akt. (E^*/mg)
Rohextrakt	133	3.3	100	0.39	0.43
CTAB-Überstand	143	6.8	109	0.38	0.86
Al C_γ-Überstand	35	9.4	73	0.32	1.00
Sepharose-6B I	9.8	44.8	54	0.27	4.03
Sepharose-6B II	7.6	61.56	31.4	0.21	3.82
DEAE-Sephadex-A50	5.0	125.0	12	0.26	10.8

E^* = bestimmt als Einheiten Acetyl-S-Citrat-Lyase gebildet aus HS-Citrat-Lyase pro min. Vergleiche Werte aus Tab. 5.

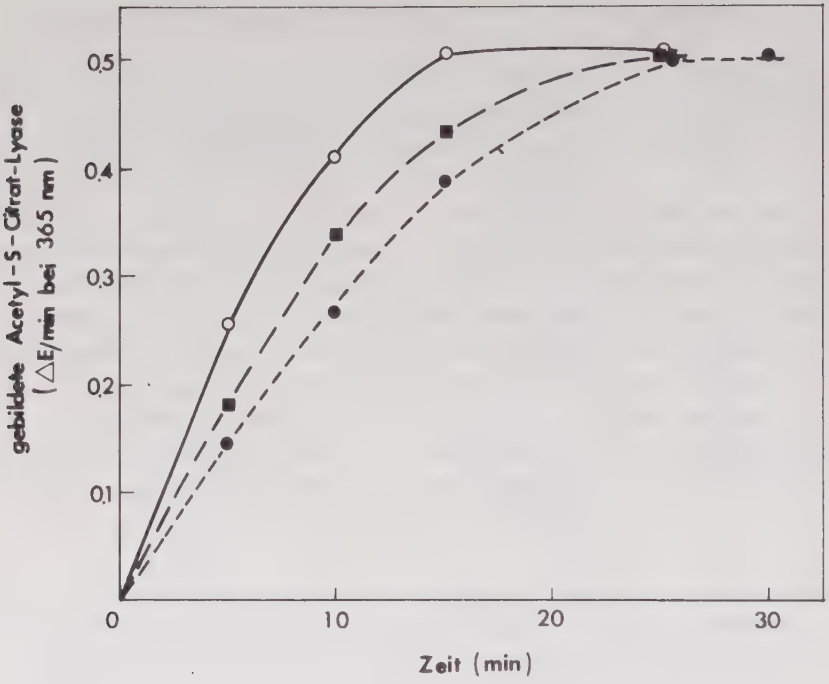


Abb. 20: ATP und Acetat-abhängige Reaktivierung desacetylierter Citrat-Lyase in Rohextrakt und angereicherten Fraktionen

Desacetylierte Citrat-Lyase wurde, wie in METHODEN beschrieben, hergestellt. Reaktivierungsansätze enthielten 3 E HS-Enzym in einem Endvolumen von 0.5 ml. In periodischen Abständen wurden Aliquots entnommen (20 µl) und auf Citrat-Lyase-Aktivität geprüft.

-○-○- Rohextrakt

-■-■- Enzym nach 1. Sepharose-6B-Gelfiltration

-●-●- Enzym nach DEAE-Sephadex-A50-Gelfiltration

gleichgeblieben. Innerhalb der Anreicherung nahm die Reaktivierungsgeschwindigkeit um 30% ab. Diesen Werten, reproduziert in mehreren Versuchen, standen einige Experimente gegenüber, bei denen der Level an acetylierendem Enzym während der Anreicherung nicht abgenommen hatte. Welcher stabilisierende Faktor dabei eine Rolle gespielt hatte, konnte bis jetzt nicht geklärt werden. In Betracht zu ziehen sind: Die Anreicherungen waren teilweise mit älteren Zellen durchgeführt worden.

3.5. Studium der enzymatischen Reaktivierung unter verschiedenen Bedingungen

3.5.1. Reaktivierung in Abhängigkeit von Ionenkonzentration, DTE-Konzentration und Temperatur

Verschiedene Tests wurden mit dem acetylierenden Enzym durchgeführt. Aus Abb. 21a geht eindeutig die Abhängigkeit der enzymatischen Reaktivierung von der Mg^{2+}-Ionenkonzentration im Inkubationsansatz hervor. Maximale Reaktivierungsgeschwindigkeiten ergaben sich in einem Bereich von 2-10 mM Mg^{2+} im Inkubationsansatz. Fehlten Mg^{2+}-Ionen, so war nur eine langsame Acetylierung meßbar und bei Einsatz des Metallionen-chelatisierenden Reagenz EDTA erfolgte eine noch geringere Reaktivierung.

Die Abhängigkeit von der Temperatur während der Inkubation gibt Abb. 21b wieder. Eine schwache Aktivität war bei 0^{o} C meßbar, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde schon bei Zimmertemperatur erreicht.

Die notwendige DTE-Konzentration im Reaktivierungsansatz war abhängig vom Alter des Enzyms. Je älter das Enzym wurde, um so mehr erhöhte sich der Wert für die optimale DTE-Konzentration im Reaktivierungsansatz.

Abb. 21: Reaktivierung inaktiver Citrat-Lyase in Abhängigkeit von a) Mg^{2+}-Ionenkonzentration, b) Temperatur und c) + d) DTE-Konzentration

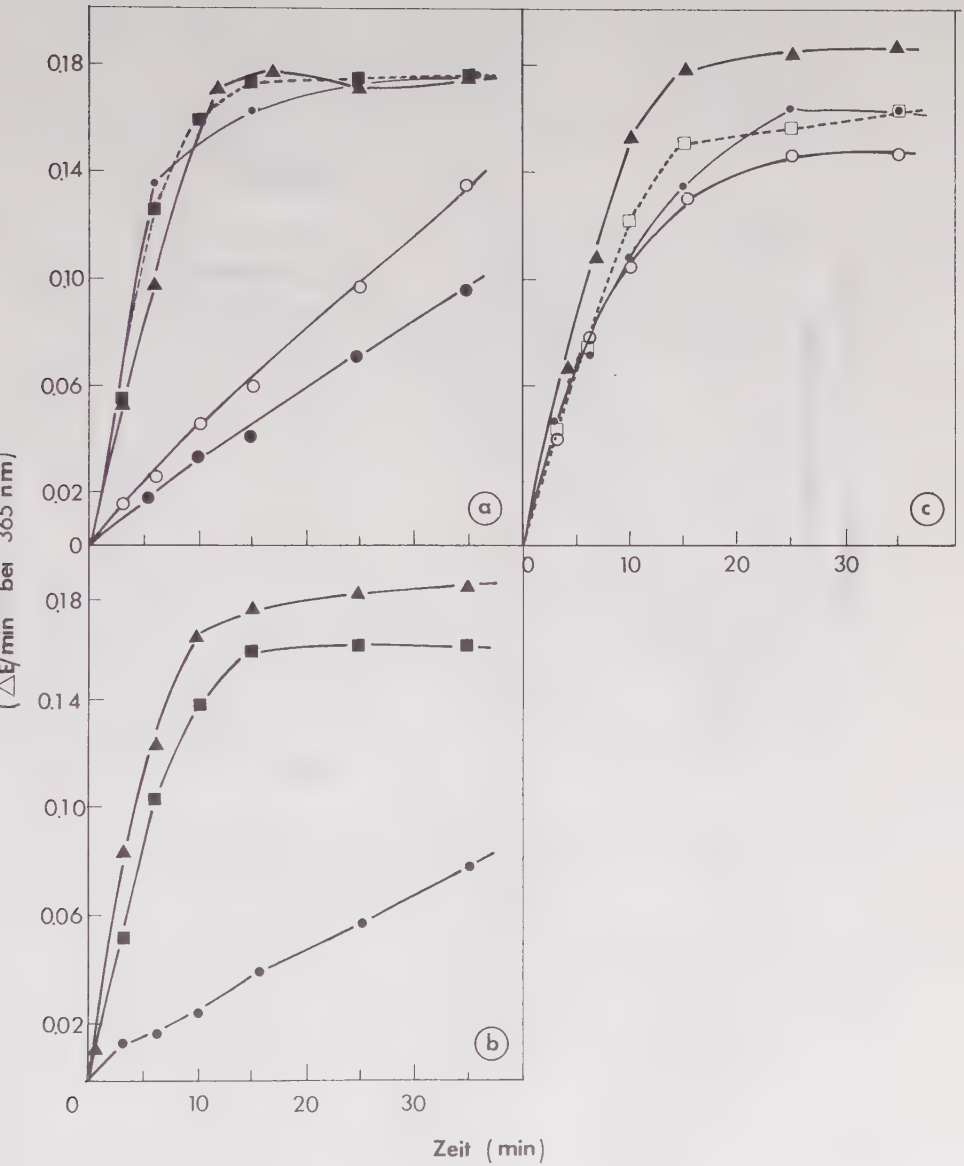
Desacetylierte CL wurde,wie in METHODEN beschrieben, hergestellt. Die Testansätze enthielten bis auf d) 1 E von SH-Enzym in einem Endvolumen von 0.5 ml. 20 µl wurden periodisch entnommen und die CL-Aktivität bestimmt. Testansatz d) enthielt 3 E SH-Enzym.

21a. Testansatz ohne $MgCl_2$ + 3 mM EDTA —●—●—
Testansatz ohne $MgCl_2$ —○—○—
Testansatz + 2 mM $MgCl_2$ —▲—▲—
Testansatz + 6 mM $MgCl_2$ —■—■—
Testansatz + 10 mM $MgCl_2$ —•—•—

21b. Das SH-Enzym wurde mit 4 mM $MgCl_2$ und 6 mM DTE bei Raumtemperatur vorinkubiert, mit ATP und Acetat erfolgte die Inkubation darauf bei angegebener Temperatur:
Inkubation bei 0° C —•—•—
Inkubation bei 27° C —▲—▲—
Inkubation bei 30° C —■—■—

21c. Das SH-Enzym wurde vor Zugabe von ATP und Acetat 5-10 min mit DTE inkubiert. Die $MgCl_2$-Konzentration betrug 4 mM.
Testansatz + 1 mM DTE —○—○—
Testansatz + 2 mM DTE —•—•—
Testansatz + 4 mM DTE —▲—▲—
Testansatz + 8 mM DTE —□—□—

21d. Reaktivierung von zuvor inaktiviertem Enzym mit 4 mM und 10 mM DTE. Der Inkubationsansatz enthielt 2 mM $MgCl_2$ und kein DTE.
Inaktivierung mit 4 mM DTE —●—●—
Inaktivierung mit 10 mM DTE —○—○—


0,18
0,14
0,10
0,06
0,02
0
a
0
10
20
30
c
0,18
0,14
0,10
0,06
0,02
b
0
10
20
30
Zeit (min)
(ΔE/min bei 365 nm)

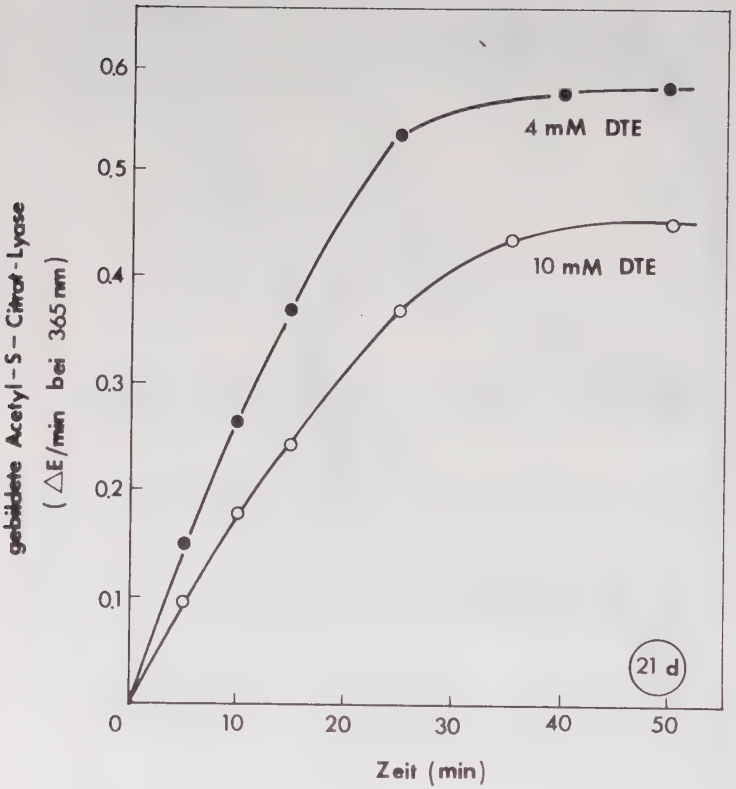


Abb. 21d: Legende s. Seite 96

Aus Abb. 21c ist die Abhängigkeit der Reaktivierungsgeschwindigkeit von der Konzentration des Reduktionsmittels DTE im Reaktivierungsansatz bei einem 4 Wochen alten Enzym ersichtlich. Zu niedrige Konzentrationen (bis 2 mM) ließen die volle Aktivität nicht wirksam werden, oder es lagen oxidierte Stellen inaktiver CL vor, während hohe Konzentrationen (6-10 mM) die Aktivität hemmten.

Welche Wirkung zu hohe DTE-Konzentrationen auf das acetylierende Enzym hatten, wurde in folgendem Versuch deutlich. Wurde die DTE-Menge im Inaktivierungsansatz von 4 auf 8-10 mM erhöht, so wurde die Desacetylierung zwar beschleunigt, die anschließende Reaktivierungsgeschwindigkeit lag aber um 35% unter dem normalen Wert (Abb. 21d).
Wurde Ligase mit SH-Enzym in Gegenwart von 4 und 8-10 mM DTE 3 Wochen lang bei 4° C aufbewahrt, so veränderte sich das Verhältnis.

Eine geringfügig höhere Reaktivierungsgeschwindigkeit wurde mit der durch 8-10 mM DTE inaktivierten Enzymlösung gemessen. Die Versuche wurden ohne DTE-Zugabe im Inkubationsansatz durchgeführt. Erklärbar wurden diese Vorgänge durch die langsame Autoxidation des überschüssigen DTE während der längeren Aufbewahrung.

3.5.2. Reaktivierung in Abhängigkeit von eingesetzter inaktiver Citrat-Lyase-Konzentration

Abb. 22 zeigt den Verlauf der Acetylierungsreaktion bei Einsatz von unterschiedlichen Mengen an SH-Citrat-Lyase. Parallele Ansätze, bei denen kein Zusatz von ATP oder Acetat erfolgt war, sind in der Abbildung mit eingeschlossen. Zur Durchführung dieses Versuches war es wichtig zu wissen, ob bei unterschiedlicher SH-Konzentration aber Messung gleicher Einheiten reaktivierter Citrat-Lyase im Testansatz die Reaktionsgeschwindigkeit die gleiche war.

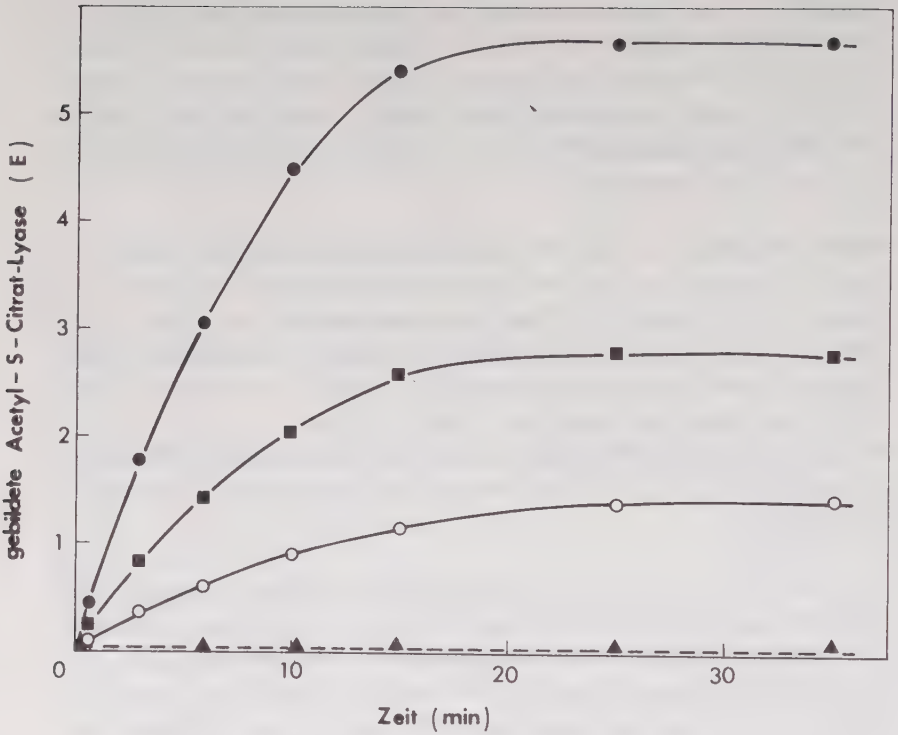


Abb. 22: Verlauf der Acetylierungsreaktion in Abhängigkeit von zunehmender Konzentration an desacetylierter Citrat-Lyase

1.25, 2.5 und 5 Einheiten inaktive Citrat-Lyase wurden wie in Abb. 21 beschrieben inkubiert. Aliquots wurden entnommen und die Citrat-Lyase-Aktivität im Testansatz bestimmt. Die Aktivität, die durch enzymatische Acetylierung gemessen wurde, lag um 15-30% höher als die durch chemische Acetylierung mit Acetyl-Imidazol erhaltene Aktivität.

—○—○— 1.25 E
—■—■— 2.5 E
—●—●— 5.0 E
—▲—▲— 5.0 E minus ATP und Acetat

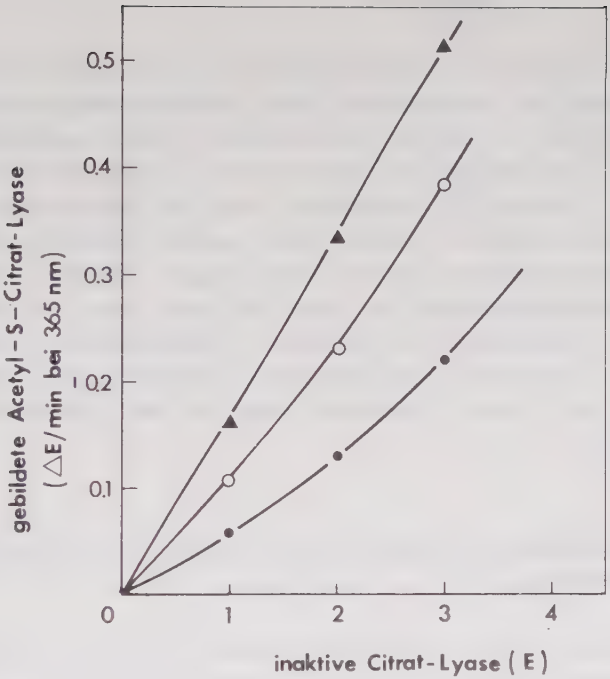


Abb. 23: Vergleich der Reaktivierungsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Konzentrationen desacetylierter Citrat-Lyase

Testansatz wie unter Abb. 21 beschrieben.

—●—●— Reaktivierungsgeschwindigkeit nach 5 min
—○—○— Reaktivierungsgeschwindigkeit nach 10 min
—▲—▲— Reaktivierungsgeschwindigkeit nach 20 min

Aus Abb. 22 ist abzulesen, daß unabhängig von der zugeführten CL-Menge (SH-Form) die vollständige Acetylierung des Enzyms 25 min bei 25° C benötigte.

In Abb. 22 wurde die Zeitabhängigkeit der Reaktivierungsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen SH-Enzym-Mengen betont, während in Abb. 23 der gleiche Versuch in einer anderen Auftragung die Abhängigkeit von der Konzentration des SH-Enzyms hervorhob. Daraus ist ersichtlich, daß der gemessene Wert für die gebildete Acetyl-S-Citrat-Lyase nach 5 min bei steigenden SH-Enzym-Mengen nicht proportional zunimmt, sondern erst nach 20 min eine Proportionalität erreicht wird. Die Aktivität, die nach vollständiger enzymatischer Reaktivierung erreicht wurde, lag immer um 15-30% höher als der durch chemische Acetylierung mit 1-Acetyl-Imidazol erreichte Wert (vergleiche Tab. 13 + 15).

3.5.3. Vergleich der Reaktivierung mit ATP, GTP, UTP und Acetyladenylat

Wie berichtet, trat keine Reaktivierung der desacetylierten Citrat-Lyase bei Fehlen eines der beiden Substrate Acetat oder ATP ein. Die Menge von 0.1 mM ATP im Inkubationsansatz ergab 100%ige Desacetyl-CL-Reaktivierung und maximale Reaktivierungsgeschwindigkeit, die sich durch Erhöhung der ATP-Konzentration bis 1 mM nicht weiter steigern ließ. Bei Ersatz des Adenylats durch GTP oder UTP erfolgte keine Reaktion (vgl. Abb. 25). Wurden unterschiedliche Mengen an inaktiver Citrat-Lyase sofort im Testansatz von 1 ml mit ATP, Acetat und Citrat inkubiert, so erfolgte eine langsame Citrat-Spaltung. Nach Ablauf der Reaktion und Erreichen der normalen Reaktivierungszeit erfolgte eine zweite Citrat-Zugabe. Die anschließende rasche Citrat-Spaltung entsprach dem jetzt vollständig reaktivierten Enzym (Abb. 24). Eine Reaktionsinaktivierung konnte nicht festgestellt werden.

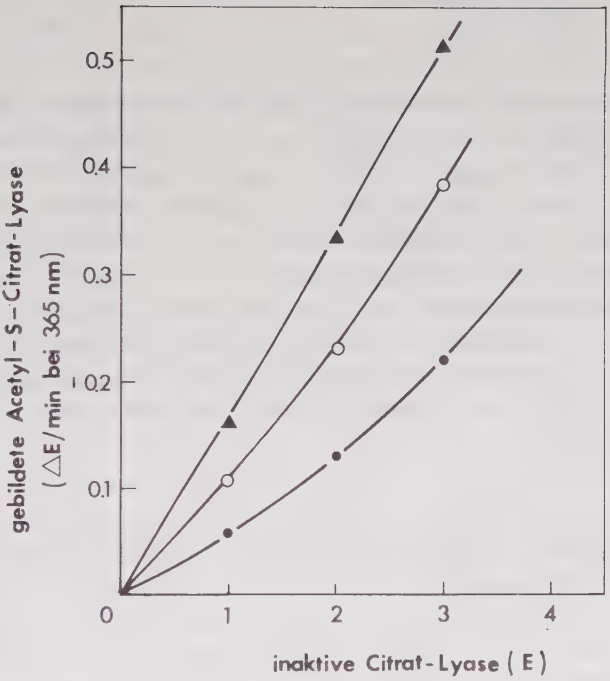


Abb. 23: Vergleich der Reaktivierungsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Konzentrationen desacetylierter Citrat-Lyase

Testansatz wie unter Abb. 21 beschrieben.

—●—●— Reaktivierungsgeschwindigkeit nach 5 min
—○—○— Reaktivierungsgeschwindigkeit nach 10 min
—▲—▲— Reaktivierungsgeschwindigkeit nach 20 min

Aus Abb. 22 ist abzulesen, daß unabhängig von der zugeführten CL-Menge (SH-Form) die vollständige Acetylierung des Enzyms 25 min bei 25° C benötigte.

In Abb. 22 wurde die Zeitabhängigkeit der Reaktivierungsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen SH-Enzym-Mengen betont, während in Abb. 23 der gleiche Versuch in einer anderen Auftragung die Abhängigkeit von der Konzentration des SH-Enzyms hervorhob. Daraus ist ersichtlich, daß der gemessene Wert für die gebildete Acetyl-S-Citrat-Lyase nach 5 min bei steigenden SH-Enzym-Mengen nicht proportional zunimmt, sondern erst nach 20 min eine Proportionalität erreicht wird. Die Aktivität, die nach vollständiger enzymatischer Reaktivierung erreicht wurde, lag immer um 15-30% höher als der durch chemische Acetylierung mit 1-Acetyl-Imidazol erreichte Wert (vergleiche Tab. 13 + 15).

3.5.3. Vergleich der Reaktivierung mit ATP, GTP, UTP und Acetyladenylat

Wie berichtet, trat keine Reaktivierung der desacetylierten Citrat-Lyase bei Fehlen eines der beiden Substrate Acetat oder ATP ein. Die Menge von 0.1 mM ATP im Inkubationsansatz ergab 100%ige Desacetyl-CL-Reaktivierung und maximale Reaktivierungsgeschwindigkeit, die sich durch Erhöhung der ATP-Konzentration bis 1 mM nicht weiter steigern ließ. Bei Ersatz des Adenylats durch GTP oder UTP erfolgte keine Reaktion (vgl. Abb. 25). Wurden unterschiedliche Mengen an inaktiver Citrat-Lyase sofort im Testansatz von 1 ml mit ATP, Acetat und Citrat inkubiert, so erfolgte eine langsame Citrat-Spaltung. Nach Ablauf der Reaktion und Erreichen der normalen Reaktivierungszeit erfolgte eine zweite Citrat-Zugabe. Die anschließende rasche Citrat-Spaltung entsprach dem jetzt vollständig reaktivierten Enzym (Abb. 24). Eine Reaktionsinaktivierung konnte nicht festgestellt werden.

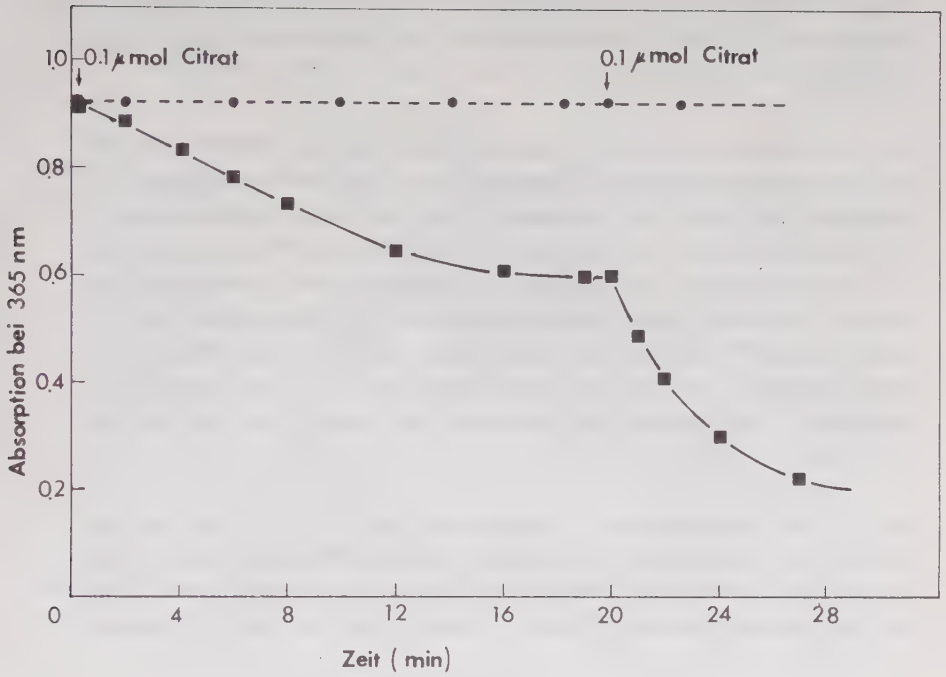


Abb. 24: Reaktivierung inaktiver Citrat-Lyase im CL-Testansatz ohne Vorinkubation mit ATP und Acetat

0.5 E inaktive Citrat-Lyase wurden in einem Testansatz von 1 ml in Tris-Acetat-Puffer (50 mM) mit 0.2 µmol $MgCl_2$, 0.1 µmol ATP und 5 µmol Acetat sowie 0.1 µmol Citrat inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion erfolgte die zweite Zugabe von 0.1 µmol Citrat. Bei Kontrollen ohne ATP war keine Citrat-Lyase-Aktivität meßbar.

—●—●— Kontrolle minus ATP

—■—■— 0.5 E Desacetyl-Citrat-Lyase

Nachdem festgestellt worden war, daß das reaktivierende Enzym mit der Citrat-Lyase assoziiert vorlag, schien eine Beteiligung dieser Aktivität an dem Ausbleiben der Reaktionsinaktivierung möglich.

Bei Versuchen zur Prüfung der Citrat-Lyase auf Reaktionsinaktivierung waren dem Testansatz Glucose und Hexokinase zugefügt worden. Es sollte sichergestellt sein, daß Spuren von ATP entfernt waren, so daß dem acetylierenden Enzym die Substrate entzogen waren. Die gemessene Reaktion wäre allein auf die Citrat-Lyase-Aktivität zurückzuführen. Die Glucosekonzentration betrug 10 mM in 1 ml Testansatz, die Hexokinasekonzentration 100 µg. 0.1 E Citrat-Lyase wurde mit 0.1 µmol Mg-Citrat inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion erfolgte eine weitere Zugabe von 0.1 µmol Mg-Citrat.

Die Citrat-Lyase-Aktivität entsprach den üblichen Werten. Das ΔE/min betrug nach der 1. ~~Citrat~~-Zugabe 0.09, nach der 2. Zugabe 0.08/0.085. Nach diesen Ergebnissen war eine Beteiligung der acetylierenden Aktivität am Ausbleiben der Reaktionsinaktivierung auszuschließen.

Bei der enzymatischen Übertragung der Acetylgruppe auf Desacetyl-Citrat-Lyase könnte eine Beteiligung von Acetyladenylat vermutet werden. Die Untersuchungen von BERG (1956) über die Acetat-CoA-Ligase hatten gezeigt, daß sich die Acetyl-CoA-Bildung in zwei Teilschritten vollzog:

$$\text{Acetat} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{Enzym-(Acetyladenylat)} + \text{PPi}$$

$$\text{Enzym-(Acetyladenylat)} + \text{CoA-SH} \rightleftharpoons \text{Acetyl-S-CoA} + \text{AMP}$$

Die Ähnlichkeit der Acetylierungsreaktion veranlaßte die Durchführung der Reaktivierung desacetylierter Citrat-Lyase mit Acetyladenylat. Bei Einsatz von 0.1 mM Acetyladenylat erfolgte eine nur schwache Reaktion; erst bei Zugabe von 0.6 mM wurde

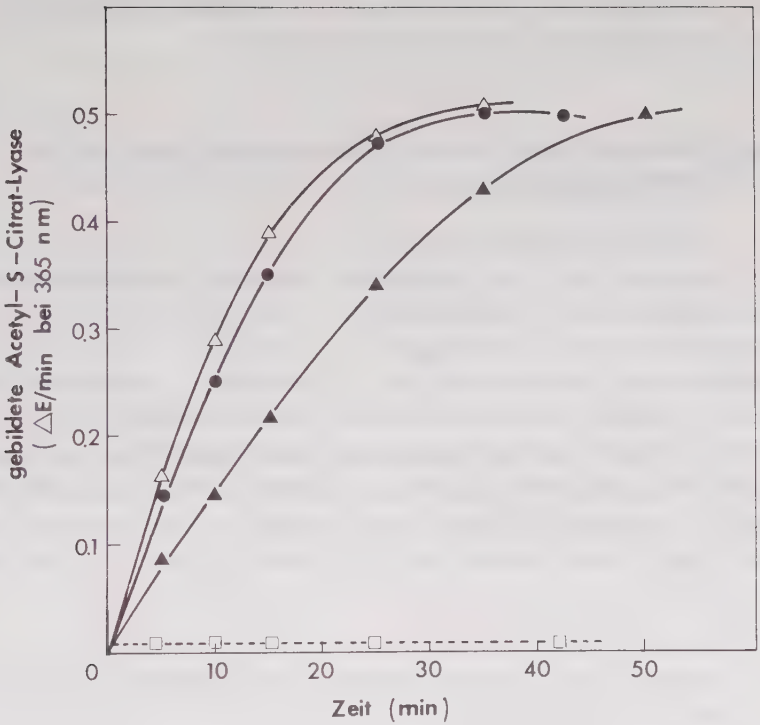


Abb. 25: Versuch der Reaktivierung in Gegenwart von ATP, GTP, UTP und Acetyladenylat

Der Inkubationsansatz enthielt 3 E inaktive Citrat-Lyase; Konzentrationen wie in Abb. 21 angegeben. ATP wurde durch GTP oder UTP ersetzt. Bei Inkubation mit Acetyladenylat fehlten ATP und Acetat.

—▲—▲— 0.1 mM Acetyladenylat

—△—△— 0.6 mM Acetaladenylat

—●—●— 0.1 - 1.0 mM ATP + 5 mM Acetat

—□—□— 1.0 mM GTP oder UTP

eine Geschwindigkeit erreicht, die der mit ATP und Acetat erzielten entsprach (Abb. 25). Hierdurch wurde angedeutet, daß freies Acetyladenylat wohl nicht als Intermediärprodukt auftrat. Natürlich war nicht ausgeschlossen, daß enzymgebundenes Acetyladenylat das Intermediärprodukt war.

3.5.4. Reaktivierung 1. nach Inkubation mit Harnstoff und 2. nach Inaktivierung aktiver CL mit Hydroxylamin

Wurde inaktives Enzym vor Inkubation mit ATP und Acetat mit 2 M Harnstoff für 5 min behandelt, so erfolgte trotzdem eine Reaktivierung des inaktiven Enzyms. Die Geschwindigkeit der Reaktion war um 30% verringert.
Erfolgte eine Inaktivierung mit Hydroxylamin anstelle von DTE, so war ebenfalls eine enzymatische Acetylierung meßbar, nachdem die inaktive Citrat-Lyase zuvor mit 4 mM DTE inkubiert worden war. Die Reaktivierung war demnach unabhängig von der Herstellungsart inaktiver Citrat-Lyase.

3.6. Nachweis der Substratspezifität des acetylierenden Enzyms von *S. diacetilactis*

Es wurde geprüft, ob das acetylierende Enzym von *S. diacetilactis* in der Lage war, desacetylierte Citrat-Lyase von anderen Mikroorganismen zu aktivieren.
Tab. 13 gibt die Ergebnisse der Experimente wieder, in denen desacetylierte Citrat-Lyase von *Klebsiella aerogenes, Rhodopseudomonas gelatinosa, Leuconostoc citrovorum* und *Streptococcus diacetilactis* mit ATP und Acetat inkubiert worden waren. Nach 30 min Inkubation wurde die Lyase-Aktivität bestimmt; wie erwartet, waren nur die Lyasen von *S. diacetilactis* und *L. citrovorum* unter diesen Bedingungen acetyliert worden. Chemische Reaktivierung mit Acetyl-Imidazol ergab in allen vier Fällen aktive Citrat-Lyase.

Tab. 13: Reaktivierung desacetylierter Citrat-Lyase von *S. diacetilactis*, *L. citrovorum*, *K. aerogenes* und *R. gelatinosa* nach Inkubation mit ATP und Acetat oder Acetyl-Imidazol

Art der Citrat-Lyase	Citrat-Lyase-Aktivität		
	Desacetyl. Enzym	Inkubation mit ATP und Acetat	Behandlung mit 1-Acetyl-Imidazol
	(ΔE_{365}/min pro 20 µl Aliquot)		
S. diacetilactis	< 0.002	0.52	0.40
K. aerogenes	< 0.002	< 0.002	0.41
R. gelatinosa	< 0.002	< 0.002	0.40
L. citrovorum	< 0.002	0.41	0.35

Desacetylierte CL wurde, wie in METHODEN beschrieben, hergestellt. Die Inkubationsansätze enthielten 3 E HS-Enzym in einem Endvolumen von 0.5 ml. Nach 30 min Inkubation wurden 20 µl entnommen und die Citrat-Lyase-Aktivität geprüft (Endvolumen: 1 ml). In Parallelansätzen wurde mit 1-Acetyl-Imidazol reaktiviert.

Nun wurde getestet, ob das acetylierende Enzym von *S. diacetilactis* in der Lage war, desacetylierte Citrat-Lyase von *K. aerogenes* und *R. gelatinosa* zu acetylieren. Jeweils 1 Einheit der Lyase von *S. diacetilactis* wurde mit 2 Einheiten der anderen Lyasen (in der HS-Form) in Gegenwart von ATP und Acetat inkubiert. Wie Tab. 14 zeigt, konnte eine Zunahme der Aktivität nicht gemessen werden. Das acetylierende Enzym von *S. diacetilactis* war also spezifisch für die Citrat-Lyase aus diesem Bakterium.

Tab. 14: Prüfung auf Acetylierbarkeit desacetylierter Citrat-Lyase von *K. aerogenes* und *R. gelatinosa* durch das acetylierende Enzym von *S. diacetilactis*

Inkubationszeit	Citrat-Lyase-Aktivität		
	1 E CL von *S. diacetilactis*	1 E CL von *S. diacetilactis* + 2 E desacetyl-CL von *K. aerogenes*	1 E CL von *S. diacetilactis* + 2 E desacetyl-CL von *R. gelatinosa*
min	ΔE_{365}/min	ΔE_{365}/min	ΔE_{365}/min
0.66	0.110	0.109	0.112
3	-	0.106	0.112
10	-	0.105	0.106
15	0.107	0.108	0.111
nach chemischer Acetylierung	0.098	0.290	0.305

2 Einheiten desacetylierte CL + 1 Einheit Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* wurden in Gegenwart von ATP und Acetat inkubiert (Endvolumen: 0.5 ml). Citrat-Lyase-Aktivität wurde in 20 µl Aliquots bestimmt.

3.7. Inkubation aktiver Citrat-Lyase mit ATP und Acetat oder Acetyl-Imidazol nach Behandlung mit DTE

Wie in vorangegangenen Versuchen beschrieben, nahm die Citrat-Lyase-Aktivität bei Alterung und je nachdem, ob das Enzym während der Anreicherung partiell denaturiert worden war, ab. Der Aktivitätsverlust beruhte auf Abspaltung der Acetylgruppe. Zum Teil lag die Sulfhydrylgruppe reduziert, meist oxidiert, vor.

In Tab. 15 wirdverdeutlicht, daß die Summe der durch DTE reduzierten zuvor oxidierten Stellen und reduziert vorliegenden Stellen im Alterungsprozeß abnahm und daß nach Inkubation mit einem Reduktionsmittel eine chemische und enzymatische Acetylierung möglich war. Aus den Werten kann abgelesen werden, daß die chemische Acetylierung nicht vollständig war, da nach enzymatischer Reaktivierung ein höherer Wert erzielt wurde.

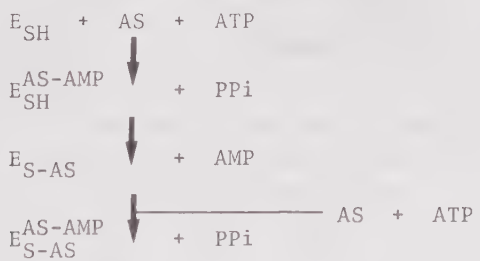
Tab. 15: Chemische und enzymatische Acetylierung aktiver Citrat-Lyase

Inkubation	Alter der CL: Aktivität:	4 Wochen E/ml	= in %	8 Wochen E/ml	= in %	10 Wochen E/ml	= in %
- Acetyl-Imidazol		363.6	100	335	100	179.6	100
+ Acetyl-Imidazol		709.09	195	456,8	136	169.6	94.7
+ DTE + Acetyl-Imidazol		875.4	240	852.2	254	279.4	156.0
+ DTE + ATP + Acetat		1041.2	287	954.0	284.7	337.0	189.0

Vor Inkubation mit Acetyl-Imidazol oder ATP und Acetat wurde 5 min im Testansatz (Endvolumen 1 ml) mit 2 mM DTE inkubiert. Die Inkubation mit 10 mM Acetyl-Imidazol erfolgte 5 min, anschließend wurde mit Citrat gestartet. Die Inkubation mit 0,1 mM ATP und 5 mM Acetat dauerte eine halbe Stunde, danach Zugabe von NADH und MDH und Start mit Citrat (s. METHODEN). Die Versuche wurden mit hochangereichertem Enzym durchgeführt. Kontrollversuche mit ATP und Acetat ohne vorherige DTE-Inkubation wurden ebenfalls durchgeführt.

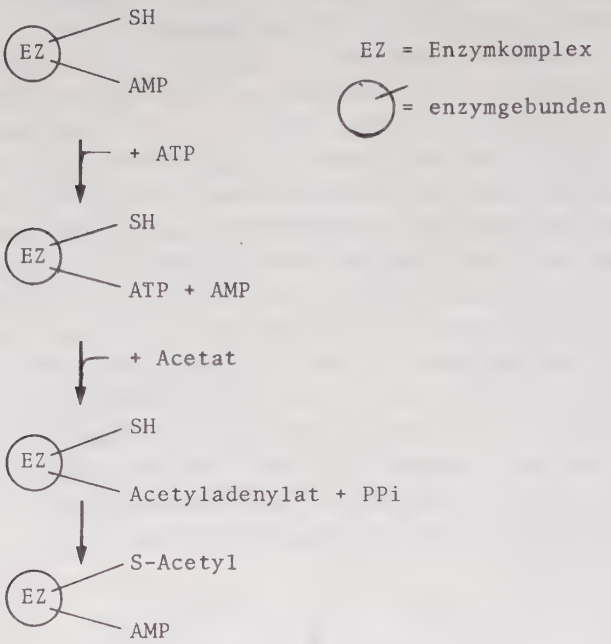
3.8. Orientierender Versuch zur Klärung des Reaktivierungsmechanismus

Neben der Frage der Bindung der Substrate (ATP und Acetat) an das acetylierende Enzym, war die Frage nach dem Aktivierungsmechanismus der SH-Citrat-Lyase zu stellen.
Unter der Annahme, daß die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* aus einem funktionalen Komplex von drei Enzymaktivitäten bestand, - 1. Acetylierendes Enzym, 2. Acyl-Transferase, 3. Lyase - konnte eine Ähnlichkeit in den Biosynthesen von Gramicidin S und Tyrocidin gesehen werden, die sich ebenfalls an einem Multienzymkomplex abspielten. Eine Aktivierung der Aminosäuren durch ATP erfolgte unter Bildung von Aminoacyl-Adenylaten, die zu anderen Acceptoren des Enzyms übertragen wurden. Mit dem Mechanismus der Peptid-Antibiotika-Biosynthese beschäftigten sich mehrere Arbeitsgruppen (ROSKOSKI et al., 1970, 1971; GEVERS et al., 1968, 1969; KLEINKAUF et al., 1969-1971; LEE et al., 1973). Die Aminosäuren waren dabei zweifach an den Enzymen gebunden: a) nicht kovalent als Aminoacyl-Adenylate und b) kovalent durch Thioesterbindungen. ROSKOSKI et al., (1970) postulierten folgendes Schema:



In Anlehnung an diesen Mechanismus wäre für den Citrat-Lyase-Komplex von *S. diacetilactis* denkbar, daß ein schon enzymgebundenes Adenylmono- oder Adenyldiphosphat mit Hilfe von freiem ATP zu einem Triphosphat phosphoryliert, mit Acetat acetyliert wird und ein anschließender Acetyltransport am Enzym zur reduzierten Sulfhydrylgruppe erfolgt, unter Bildung des aktiven Enzyms. Entsprechend könnte auch Acetat zuerst gebunden werden.

Zur Klärung der Probleme wurden erst Versuche durchgeführt, die ohne radioaktive Markierung mit P_{32} möglich waren. Folgende Modellvorstellung wurde untersucht:



Der experimentelle Ablauf (siehe Schema 2) bestand darin, inaktives SH-Enzym mit einem der Substrate der Acetat-SH-Enzym-Ligase (ATP oder Acetat) zu inkubieren, anschließend die Enzymlösung vom überschüssigen Substrat durch Dialysieren oder durch einen G25-Säulenlauf zu trennen und nachfolgend mit dem 2. Substrat zu inkubieren. Würde eine Bindung des ersten Substrates an das Enzym erfolgen, so müßte nach Inkubation des behandelten Enzyms nur mit dem zweiten Substrat im Reaktivierungsansatz eine Acetylierung erfolgen.

Zusätzlich wurde geprüft, ob reaktivierte inaktive SH-Citrat-Lyase zum zweiten Mal inaktivier- und reaktivierbar war.

Schema 2: Versuchsablauf der stufenweisen Inkubation von inaktiver Citrat-Lyase mit den Substraten des acetylierenden Enzyms -ATP und Acetat-

SH-Enzym + Acetyl. Enzym

(zur Kontrolle: 1. reaktiviert mit ATP und Acetat
2. bei 30° C inkubiert, dann reaktiviert)

	A	B
Dialyse:	-	+
Reaktivierung:	-	ATP + Acetat
Inkubation:	+ Acetat 30° C, 30 min	+ ATP 30° C, 30 min
Reaktivierung:	+ ATP - Acetat	a) - ATP + Acetat b) + ATP + Acetat
Dialyse	+	+
Reaktivierung:	a) + ATP - Acetat b) + ATP + Acetat	a) - ATP + Acetat b) + ATP + Acetat
Inkubation:	+ ATP 30° C, 30 min	+ Acetat 30° C, 30 min
Reaktivierung:	a) - ATP - Acetat b) - ATP + Acetat c) + ATP + Acetat	a) - ATP - Acetat b) + ATP - Acetat c) + ATP + Acetat
Dialyse:	+	+
Reaktivierung:	a) - ATP - Acetat b) - ATP + Acetat c) + ATP - Acetat d) + ATP + Acetat	a) - ATP - Acetat b) + ATP - Acetat c) - ATP + Acetat d) + ATP + Acetat

Die Inkubation erfolgte jeweils bei 30° C im Wasserbad.
Die unter a, b, c und d angegebenen Möglichkeiten geben die Zusammensetzung der Substrate im Reaktivierungsansatz wieder.

Die Konzentration an ATP (0,25 oder 0,5 mM) oder Acetat (12,5 mM) während der Inkubation bei 30° C wurde so gewählt, daß sie nach der Verdünnung im Reaktivierungsansatz mit 3 Einheiten SH-Enzym der üblichen entsprach (ATP 0,1 mM; Acetat 5 mM).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der hypothetische Reaktivierungsvorgang nicht bestätigt werden konnte. Es ließ sich keine Reaktivierung bei Fehlen eines der beiden Substrate im Reaktivierungsansatz nachweisen.

Auffallend war, daß wiederholte Inkubation bei 30° C die Reaktivierungsgeschwindigkeit im Normaltest ansteigen ließ. Die chemische Acetylierbarkeit der SH-Enzymproben nahm nach den einzelnen Behandlungsschritten relativ geringfügig ab, am Ende des Versuches waren es 25%. Die Abnahme der Enzymaktivität ist auf Proteindenaturierung zurückzuführen.

Ein Unterschied in der Reaktivierungsgeschwindigkeit wurde gemessen, je nachdem, ob die inaktive Citrat-Lyase zuerst mit Acetat (A) oder ATP (B) inkubiert worden war. So lag die Geschwindigkeit nach ATP-Vorinkubation jeweils höher, als nach der Acetat-Vorinkubation. Bei einer Konzentration von 0,5 mM ATP war die Reaktivierungsgeschwindigkeit doppelt so hoch wie bei der Inkubation mit 0,25 mM, obwohl im Sättigungsbereich gearbeitet worden war. Außerdem wurde festgestellt, daß trotz Vorhandensein von ATP im Überschuß während der 30° C Inkubation im anschließenden Reaktivierungsansatz frische ATP-Zugabe erforderlich war, was auf eine Hydrolysierung des ATP schließen ließe. Der angenommene Reaktivierungsmechanismus ließ sich zwar nicht bestätigen, jedoch konnte ein positiver Einfluß von ATP auf das Enzym gemessen werden.

Wurde das unterschiedlich inkubierte Enzym jeweils nach der Dialyse normal mit ATP und Acetat inkubiert, so nahm die Reaktivierungsgeschwindigkeit schrittweise ab, bei System (A) mehr als bei (B) (siehe Schema), was auf Denaturierung des Enzyms

zurückzuführen war. In Abb. 26 ist die Reaktivierungsgeschwindigkeit normal und nach der 1. und 2. Dialyse (A) aufgezeichnet. Während nach der 1. Dialyse nach der Acetat-Vorinkubation die Abnahme der Geschwindigkeit noch gering war, war ein starker Abfall nach der 2. Dialyse zu verzeichnen, was sich in einer Reaktivierungsdauer über Stunden und unregelmäßiger Reaktivierungsgeschwindigkeit äußerte.

Parallel zu diesen Versuchen war geprüft worden, ob inaktives SH-Enzym, reaktiviert mit ATP und Acetat, zum zweiten Mal inaktivierbar und reaktivierbar war. Es konnte gezeigt werden, daß ein mehrmaliges Inaktivieren und Reaktivieren des Enzyms möglich war. Ein Verlust von 40% an Reaktivierungsgeschwindigkeit trat nach der zweiten Inaktivierung auf.

Um festzustellen, an welcher Stelle die Acetylase am Enzymkomplex gebunden ist, müßte eine Inkubation mit Acetat und radioaktiv markiertem ATP erfolgen. Mit Hilfe von Harnstoff würde das Enzym in Untereinheiten zerlegt und säulenchromatographisch oder elektrophoretisch aufgetrennt werden. Anhand der Markierung würde die Bindung der Acetat: SH-Enzym-Ligase festzustellen sein. Bevor dieses Thema behandelt werden sollte, wurde das Verhalten der Citrat-Lyase in Gegenwart von Harnstoff getestet und die Lyase elektronenmikroskopisch untersucht.

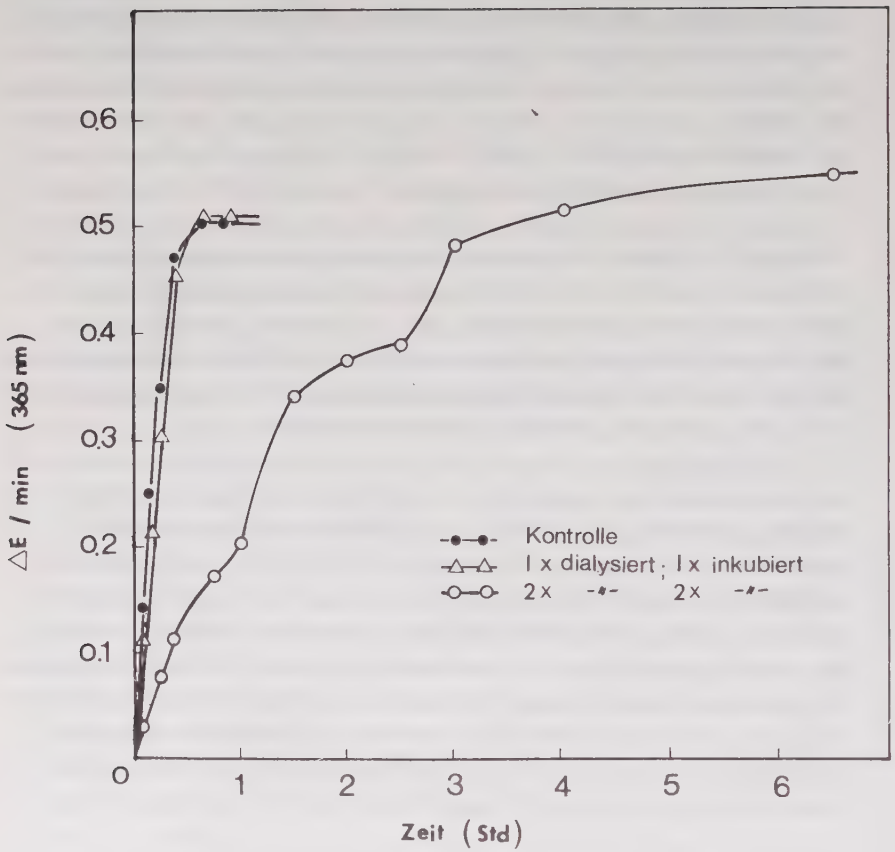


Abb. 26: Reaktivierung der Citrat-Lyase nach zusätzlicher Behandlung durch Inkubation und Dialyse

Die Reaktivierung erfolgte mit ATP und Acetat nach entsprechender Behandlung, wie im Text angeführt (Testansatz siehe METHODEN).

IV. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Quartärstruktur der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis*

Nachdem die Reinheit der Citrat-Lyase mit Hilfe der Disk-Elektrophorese und der Ultrazentrifugation bewiesen worden war, lag eine interessante Aufgabe in der Aufklärung der Struktur durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und in der Zuordnung der durch SDS-Elektrophorese ermittelten verschieden großen Untereinheiten. Die Citrat-Lyase von *R. gelatinosa* war elektronenmikroskopisch untersucht worden (BEUSCHER et al., 1974). Es stellte sich die Frage nach einem eventuellen Unterschied, da das Gesamtmolekulargewicht von *S. diacetilactis* in etwa dem der CL aus *K. aerogenes* und *R. gelatinosa* entsprach, während die Anzahl und das Molekulargewicht der Untereinheiten differierte. Außerdem war eine Assoziation des acetylierenden Enzyms mit der Citrat-Lyase nachgewiesen worden.
Neben der Frage nach dem Aufbau des Enzymmoleküls sollte untersucht werden, ob ein Unterschied zwischen dem aktiven und inaktiven (acetylierten und oxidierten oder reduzierten) Enzym festzustellen war und ob das Protein dissoziier- und reaggregierbar war.

4.1. Nachweis von drei Formen für die Citrat-Lyase

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Struktur der Citrat-Lyase wurden mit Hilfe des Negativ-Kontrastierungs-Verfahrens nach VALENTINE (1959) durchgeführt, wobei verschiedene Negativ-Kontrastierungsmittel bei unterschiedlichem pH-Wert verwendet wurden, sowie keine oder vorherige Fixierung mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd in unterschiedlicher Konzentration erfolgte. Es sollte ausgeschlossen werden, daß auftretende Unterschiede im elektronenmikroskopischen Bild durch die Art der Fixierung hervorgerufen wurden. Als Kontrolle wurde in Parallelversuchen das Enzym Glutamin-Synthetase aus *E. coli* untersucht. Die beste Wiedergabe der Enzyme im elektronen-

mikroskopischen Bild wurde bei Verwendung von Uranylacetat bei pH 5 als Negativ-Kontrastierungsmittel erhalten. Die Fixierung der Enzyme mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd vor der Negativ-Kontrastierung erzielte keine bessere Erhaltung der Struktur und wurde für Routineuntersuchungen weggelassen.

Im hochgereinigten Enzympräparat der Citrat-Lyase waren drei Formen erkennbar: "Ringe", "Sterne" und "Dreiecke" (Abb. 27), die im Verhältnis von ~86% zu 7-11% zu 0.5-3% zueinander standen. Die Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte keine morphologischen Unterschiede zwischen den Ringen der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* (Abb. 28) und den Ringen von *R. gelatinosa* (BEUSCHER et al., 1974). Danach bestand die Ringform der Lyase aus zwölf Untereinheiten, die in Form zweier hexagonaler Ringe um einen zentralen optisch leeren Raum angeordnet waren, wobei stets sechs Untereinheiten die gleiche Größe hatten. Die Untereinheiten waren im Ring alternierend angeordnet; jeweils die kleinen und die großen Untereinheiten lagen übereinander. In der Aufsicht hatte die nicht exakt ringförmige Struktur einen Durchmesser von 160 Å, während die Dicke der übereinanderliegenden Ringe in der Seitenansicht etwa 100 Å betrug.

Die genaue Bestimmung der Struktur war allein durch die Interpretation der elektronenmikroskopischen Bilder nicht möglich gewesen, sondern mit Hilfe der "Markham-Rotation" erfolgt. Nach dieser Methode wurden die Negative des elektronenmikroskopischen Bildes auf einen drehbaren Untergrund, der mit Fotopapier belegt war, projeziert und je nach Größe des Drehwinkels eine Verstärkung oder Abschwächung des Kontrastes der einzelnen Untereinheiten erhalten. Abb. 29 gibt zwei Beispiele von Ringen. Die Zunahme von Kontrast und Auflösung wurde bei Verwendung der Drehwinkel 3 x 120° und 6 x 60° am deutlichsten erzielt. Die "Markham-Rotation" bewies das Vorhandensein von zwei verschieden großen Untereinheiten.

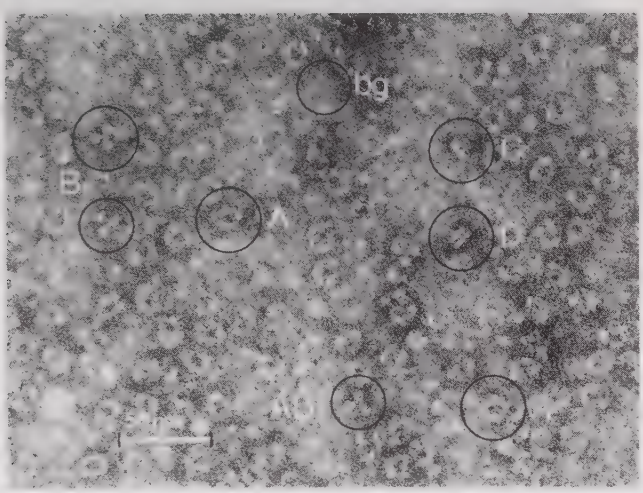


Abb. 27: Elektronenmikroskopische Darstellung der Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* nach dem Negativ-Kontrastierungsverfahren (Übersicht)

Angaben zur Fixierung und Kontrastierung des Enzympräparates s. METHODEN.
Vergrößerung: EM-Vergr. 91 000 x Nachvergr. 3,7 = Endvergr. 336 700
1 mm ≙ 29,75 Å

A = Ring

B = Stern

C = Dreieck

D = Seitenansicht (Ring oder Stern)

AB = "Übergangsform" Ring↔Stern

bg = Background (Bruchstücke)

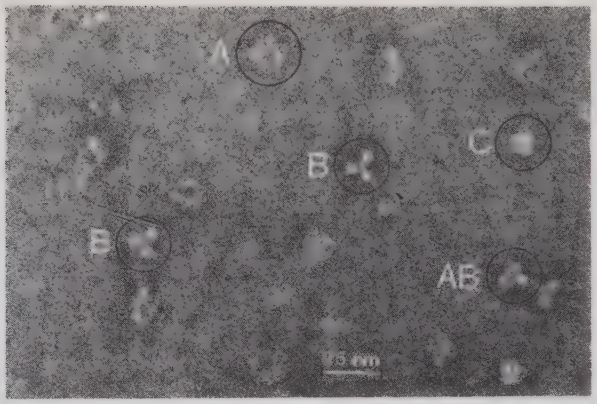


Abb. 28: Molekülkonfigurationen der Citrat-Lyase (vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 27)

Vergrößerung: EM-Vergr. 91 000 x Nachvergr. 4,5 = Endvergr. 410 000

1 mm ≙ 24,5 Å

A = Ring

AB = "Übergangsform" Ring⟷Stern

B = Stern

C = Dreieck

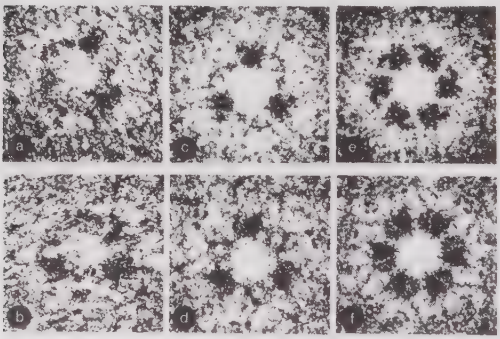


Abb. 29: "Markham-Rotation" mit den Ringen der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis*

Zwei Beispiele von Ringen:

a + b = Original-EM

c + d = jeweils 3 x 120°-Rotation

e + f = jeweils 6 x 60°-Rotation

Die ringförmige Struktur der Citrat-Lyase erschien nur in der direkten Aufsicht, während in der Seitenansicht die als "Sandwich" interpretierten Enzympartikel (BEUSCHER et al., 1974) auch in Präparationen der CL von *S. diacetilactis* nachgewiesen werden konnten (Abb. 27).

Die "Markham-Rotation" zeigte für die Sterne deutlich drei ausgeprägte "Arme" und drei schwache Intensitätsmaxima zwischen den Hauptarmen (Abb. 30). Die Dreiecke wurden durch eine innere und äußere Gruppe von Intensitätsmaxima gebildet, wobei beide Gruppen dreifache Rotationssymmetrie aufwiesen (Abb. 30). Die Abmessungen, die allen drei Formen zugrunde liegen, wie Durchmesser, Winkel und Zentrum-zu-Zentrum-Entfernungen, waren einander sehr ähnlich (Abb. 31). In Abb. 28 sind die unterschiedlichen Formen im elektronischen Bild gut sichtbar. Eine vierte Form (Abb. 32 + 28 + 30) konnte manchmal entdeckt werden, die beide Charakteristiken aufwies, und zwar sowohl die der Ringe (alternierende zirkulär angeordnete Dichteverteilungen), als auch die der Sterne (Strukturen ähnlich der "Arme", die in Winkeln von 120° zueinander angeordnet waren).

Durch das begrenzte Auflösungsvermögen in Negativ-Kontrastierungs-Präparationen konnten die Untereinheiten der verschiedenen Enzymformen nicht entdeckt werden. Es wurden Modelle der Ring- und Sternkonfiguration (Abb. 33) hergestellt, die auf den elektronenmikroskopischen Bildern beruhten. Diese wurden in ein Bad mit schwarzer Tusche getaucht, um eine Negativ-Kontrastierung zu simulieren (Abb. 34). Beim Vergleich der durch diese Prozedur erhaltenen Bilder und der durch hohe Auflösung erhaltenen Bilder der negativ-kontrastierten Enzymmoleküle konnte eine bestechende Ähnlichkeit festgestellt werden.

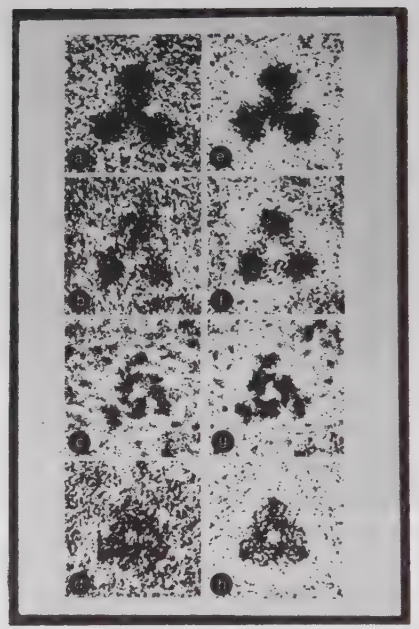


Abb. 30: "Markham-Rotation" mit den Sternen und Dreiecken der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis*

a - d = Originalbilder (EM)

a = Stern

b = "Übergangsform" Stern⟷Ring

c = Dreieck

d = Dreieck

e - h = "Markham-Rotation" der Originalbilder (Drehwinkel jeweils 3 x 120°)

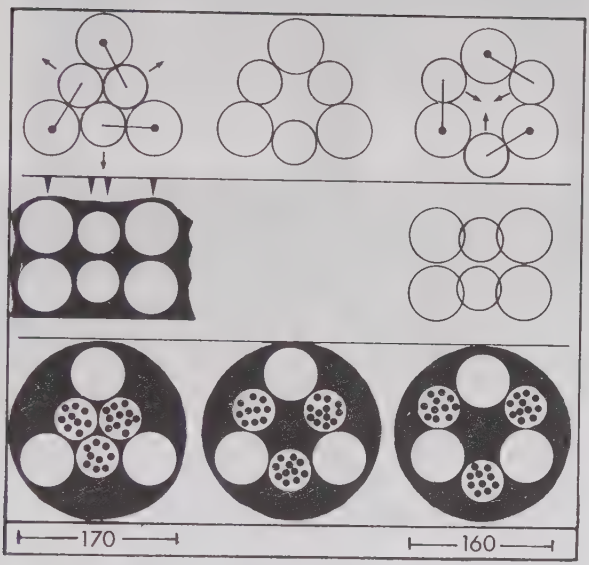


Abb. 31: Form und Abmessungen von Ring und Stern

oben: Konfigurationen (Aufsicht)
Stern - "Übergangsform" - Ring

mitte: Seitenansicht
(links: schwarz bedeutet Negativ-Kontrastierung)

unten: Aufsicht
(simulierte Negativ-Kontrastierung;
gepunktet: größere Negativ-Kontrastierungs-Dichte als in den hellen Regionen)

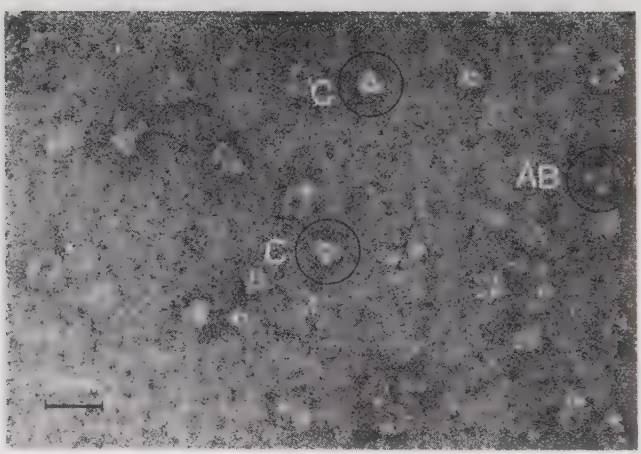


Abb. 32: Molekülkonfigurationen der Citrat-Lyase

Vergrößerung: EM-Vergr. 91 000 x Nachvergr. 4,5 = Endvergr. 410 000
1 mm ≙ 24,5 Å

AB = "Übergangsform" Ring⟷Stern
C = Dreieck

Abb. 33: Modelle für Stern- und Ring konfiguration

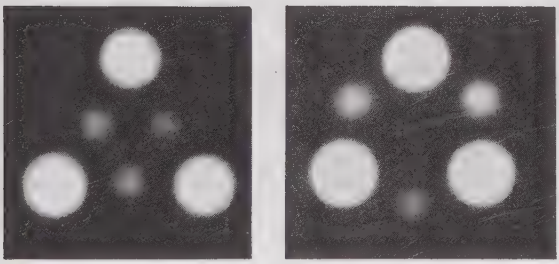


Abb. 34: Simulierte Negativ-Kontrastierung

Die Modelle aus Plastikbällen (Abb. 33) wurden in ein Bad mit schwarzer Tusche getaucht und fotografiert.

4.2. Versuche zum Nachweis der Funktion und der Beziehung der drei Formen zueinander

4.2.1. Elektronenmikroskopie von aktivem und inaktivem Enzym

BEUSCHER et al. (1974) hatten die intakte Ringstruktur als die native Gestalt des enzymatisch aktiven Enzyms angenommen, da der Anteil der Ringstrukturen bei weitem überwog, wenn enzymatisch voll aktive Enzympräparate mikroskopiert wurden. Inwieweit diese Annahme auf die Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* übertragen werden konnte, hing vom Funktionsnachweis für die anderen Formen ab, die, wie z. B. die Sterne (7-11%), einen erheblichen Anteil ausmachten.

Die Anzahl der intakten Enzymmoleküle nahm innerhalb des Alterungsprozesses bei Aufbewahrung über mehrere Wochen bei 4^{o} C gleichzeitig mit der Enzymaktivität ab (Abb. 35). Das Verhältnis von Ring und Stern veränderte sich nicht, der Anteil von Dreiecken erhöhte sich in älteren Enzympräparationen.
In weiteren Versuchen wurde inaktiviertes Enzym getestet, aktives Enzym mit unterschiedlichen Mengen an DTE oder Acetyl-Imidazol inkubiert, pH und Temperatur sowie die Ionenkonzentration variiert. Das Verhältnis von Ring und Stern konnte unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht verändert werden. Es bestand kein Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Enzym, d. h. zwischen Enzympräparaten im acetylierten, reduzierten und oxidierten Zustand.

4.2.2. Dissoziation und Reaggregation von Enzymmolekülen der CL

Es mußte ein Weg gefunden werden, der die Beziehung der drei Formen zueinander erklären konnte. Würde eine Umwandlung von einer Form in die andere gelingen, so wäre es ein Beweis, daß tatsächlich drei Formen für ein Citrat-Lyase-Molekül existierten. Deshalb wurden Dissoziations- und Reaggregationsversuche

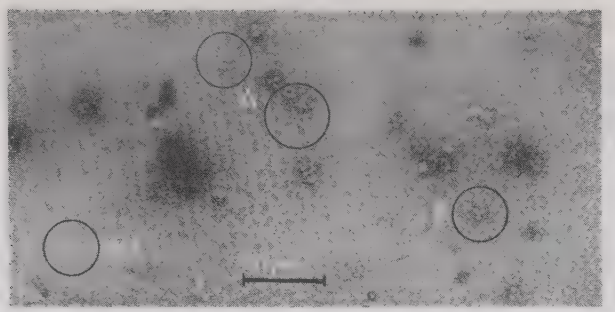


Abb. 35: Abnahme der intakten Enzymmoleküle innerhalb des Alterungsprozesses

Vergrößerung: EM-Vergr. Nachvergr. Endvergr.
34 000 x 4,5 = 150 000

1 mm ≙ 67 Å
Enzym nach 16 Tagen bei Aufbewahrung bei 4° C.
A = Ring
B = Stern
BG = Background (viele Bruchstücke)

Vergleiche Background bei frisch isoliertem Enzym in Abb. 27.

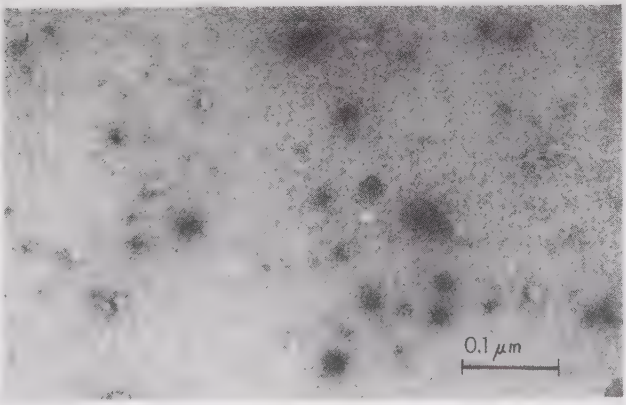


Abb. 36: Zerstörung der intakten Enzymmoleküle nach Einwirkung von 6 M Harnstoff

Enzymkonzentration und Versuchsdurchführung s. METHODEN. Kontrolle nach 1 Std. Harnstoffbehandlung.
Es ist nur Background mit Enzymfragmenten zu erkennen.

Vergrößerung: EM-Vergr. Nachvergr. Endvergr.
45 000 x 4 = 180 000

1 mm ≙ 56 Å

unternommen in der Annahme, daß eine Form während der Aggregation begünstigt würde.

Durch Einwirkung von Harnstoff sollte das Enzym zerlegt werden, durch entsprechendes Herausverdünnen desselben sollte es wieder reaggregieren. Dissoziations- und Reaggregationsversuche waren zur elektronenmikroskopischen Aufklärung der Struktur der Glutamin-Synthetase von VALENTINE et al. (1968) durchgeführt worden.

Eine Behandlung der Citrat-Lyase mit 6 M Harnstoff inaktivierte das Enzym vollständig. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Abb. 36) zeigten, daß das Enzym innerhalb einer Stunde vollständig in die Untereinheiten dissoziiert war. Die Proteinkonzentration sollte 3 mg/ml nicht übersteigen, da sonst ein geringer Prozentsatz an intakten Enzymmolekülen festzustellen war, der auch durch längere Inkubationszeit nicht zu verringern war. Es wurde bei Zimmertemperatur bei pH 7,0 inkubiert. Die Gegenwart von DTE während der Harnstoffinkubation war nicht notwendig.

Nach Reduktion des Harnstoffgehaltes durch Verdünnen war das Enzym in der Lage zu reaggregieren (Verdünnung 1:20 o. 1:50 mit Puffer). Direkt nach Verdünnen war die Enzymaktivität gleich null. Jedoch nach 1 Stunde konnten 19% der Anfangsaktivität gemessen werden. Der Prozentsatz an aktivem Enzym konnte durch Acetylierung mit 1-Acetyl-Imidazol auf 23% erhöht werden. Vorherige Behandlung mit DTE und nachfolgende chemische Acetylierung ergab eine 50%ige Aktivität. Das bewies, daß das Acyl-Carrier-Protein während der Inkubation mit Harnstoff teilweise desacetyliert und oxidiert worden war.

Inkubation der Enzymlösung mit DTE und ATP und Acetat ergab einen Anstieg an aktivem Enzym von 19 auf 35,7%. Die Acetat:SH-Enzym-Ligase war also auch teilweise aktiv im reaggregierten Enzym.

Längere Inkubation des verdünnten Enzyms führte zu keiner we-

sentlich höheren Aktivität. Der Wechsel anderer Parameter wirkte sich auf die Reaggregation aus, wie aus Tab. 16 zu ersehen ist. Die optimalen Bedingungen für diese Experimente waren in zahlreichen Versuchen zuvor bestimmt worden. So erwies sich eine Änderung der Ionenstärke im Bereich von 0,2 - 0,5 M KCL im Inkubationsansatz für die Reaggregation nicht ausschlaggebend. Die Temperatur beeinflußte die Reaggregation. Als optimal erwies sich eine Inkubation bei 30° C. Der Anteil der reaggregierten Moleküle war bei einem pH im alkalischen Bereich wesentlich geringer als bei einem pH von 6,5.

Zwei Konfigurationsformen erschienen nach der Reaggregation im elektronenmikroskopischen Bild im gleichen Verhältnis wie üblich wieder: der Ring und der Stern (Abb. 37). Das Verhältnis (~86 und 7-11%) war dasselbe wie in den Originalenzympräparaten. Es war unabhängig vom Grad der Reaggregation und veränderte sich nicht unter den angegebenen unterschiedlichen Bedingungen.
Wurde inaktiviertes Enzym denselben Dissoziations- und Reaggregationsbedingungen unterzogen, so trat auch keine Veränderung im Verhältnis bei Ring- und Sternform ein.
Eine Umwandlung der Formen ineinander war auf diesem Wege nicht möglich. Wäre die Sternform ein Fremdprotein, so müßte sie das gleiche Reaggregationsverhalten wie die Ringform haben.

Bemerkenswert war, daß bei allen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der reaggregierten Enzymlösungen die Dreieckform fehlte. Das bedeutete, daß diese Form für die Aktivität der Citrat-Lyase und des acetylierenden Enzyms nicht notwendig war. Höchstwahrscheinlich stellt diese Form das irreversibel inaktivierte Enzym dar, das nach Reaggregation nicht wieder gebildet wird, da es keine Funktion erfüllt, nach längerer Inkubation und Aufbewahrung des reaggregierten Enzyms aber wieder auftritt. Eine weitere Unterstützung dieser Hypothese konnte erbracht werden, wenn gereinigte Citrat-Lyase wieder-

Tab. 16: Dissoziation und Reaggregation von aktiver CL aus *S. diacetilactis* unter verschiedenen Bedingungen

Prozeß	Proteingehalt	Harnstoff-konzentration	Ansätze während u. nach der Reaggregation	CL Aktivität %
Dissoziation	~3/7,5 mg/ml	6 M	-	0/0.0027
Reaggregation	mg/ml			
	0.375	300 mM	- Ac + 2 mM DTE	7.1
	0.15	120 mM	- Ac + 2 mM DTE	16.6
	0.15	120 mM	- Ac + 5 mM DTE	8.5
	0.15	120 mM	- Ac + 10 mM DTE	5.2
	0.075	60 mM	- Ac + 2 mM DTE	15.2
	0.15	120 mM	- Ac - DTE	19.9
	0.075	60 mM	- Ac - DTE	19.67
	0.15	120 mM	+ Ac - DTE	23.8
	0.075	60 mM	+ Ac - DTE	22.9
	0.375	300 mM	+ Ac + 2 mM DTE	19.67
	0.15	120 mM	+ Ac + 2 mM DTE	47.3
	0.075	60 mM	+ Ac + 2 mM DTE	42.3
	0.375	300 mM	+ ATP + Acetat + 2 mM DTE	9.4
	0.15	120 mM	+ ATP + Acetat + 2 mM DTE	35.7
	0.075	60 mM	+ ATP + Acetat + 2 mM DTE	30.0

Die optimalen Bedingungen für diese Experimente (zuvor getestet) waren: Inkubation bei 30° C bei pH 6.5 und einer Ionenkonzentration des Puffers von 0.2-0.5 M KCL. CL wurde während der Reaggregation mit DTE inkubiert. Das Enzym wurde entweder mit 10 mM 1-Acetyl-Imidazol für 5 min oder mit 0.1 mM ATP und 5 mM Na-Acetat für 30 min nach Reaggregation inkubiert, um die Enzymaktivität in einem Gesamtvolumen von 1 ml zu testen. Der Testansatz: 1 ml, 50 mM KPO_4, pH 7.2, 2 mM $MgCl_2$, 0.3 mM NADH, 5 mM K-Citrat, ~0.05 E CL, 11 E MDH.
Die Enzymmoleküle wurden 1 Stunde mit Harnstoff inkubiert, die Reaggregation wurde innerhalb von 4 Stunden getestet.

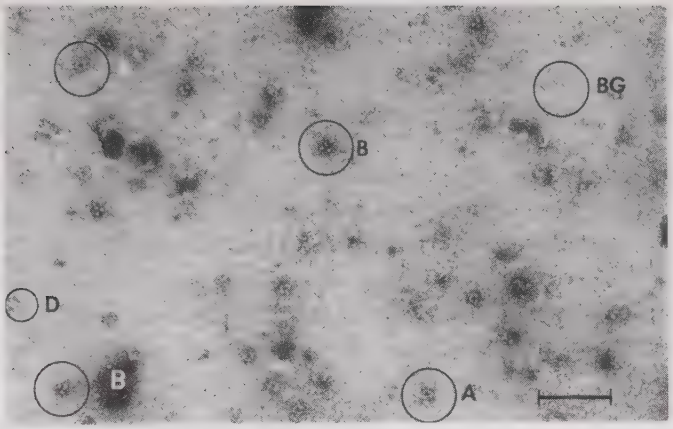


Abb. 37: Elektronenmikroskopische Aufnahme von einer reaggregierten Enzymlösung

Vergrößerung: EM-Vergr. Nachvergr. Endvergr.
34 000 x 4 = 135 000

1 mm ≙ 74 Å

Nach einer Stunde war eine Reaggregation deutlich sichtbar. Ringe und Sterne wurden beobachtet, während die Dreieckform fehlte.
Durchführung siehe METHODEN.

A = Ring

B = Stern

D = Seitenansicht, von Ring oder Stern

BG = Background mit Enzymfragmenten

holt an DEAE-Sephadex-A50 chromatographiert wurde, wie im nächsten Kapitel erläutert werden wird.

4.2.3. Versuch der Trennung der drei Formen durch Ionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie sollte versucht werden, die Formen voneinander zu trennen, da angenommen wurde, daß durch eine Konfigurationsänderung die an der Oberfläche liegenden Carboxyl- und Aminogruppen besser oder schlechter zugänglich würden und damit eine Änderung der Wechselbeziehungen mit dem Ionenaustauschmaterial hervorgerufen würde.

Wurde das typische Elutionsprofil eines DEAE-Sephadex-A50-Säulenlaufes innerhalb der Anreicherung der Citrat-Lyase betrachtet (Abb. 38), so traten zwei Proteinpeaks und eine mehr oder weniger ausgeprägte Schulter auf. Die enzymatische Aktivität wurde verglichen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Peaks ließ alle drei Formen in den verschiedenen Proben erkennen, nur hatten sich die Verhältnisse verändert, wie aus Abb. 38 zu ersehen ist. Während sich der Anteil der Ringe und Sterne vom Hauptpeak zum kleinsten Peak verringerte, erhöhte sich der Anteil der Dreiecke, so daß Ringe und Dreiecke nahezu im gleichen Verhältnis vorlagen. Der Anteil der Dreiecke erhöhte sich, je konzentrierter die Proteinlösung vorlag.

Wurde der Hauptpeak zum zweiten Mal an einer DEAE-Sephadex-A50-Säule chromatographiert, so erfolgte eine wiederholte Auftrennung in zwei Proteinpeaks (Abb. 39). Ein schmaler Proteinpeak trat vollkommen getrennt vom Hauptpeak auf. Er zeigte keinerlei Citrat-Lyase-Aktivität,und die elektronenmikroskopische Kontrolle offenbarte, daß er zu fast 100% aus Dreieckstrukturen bestand. Eine Analyse dieser Enzymlösung mit Hilfe der

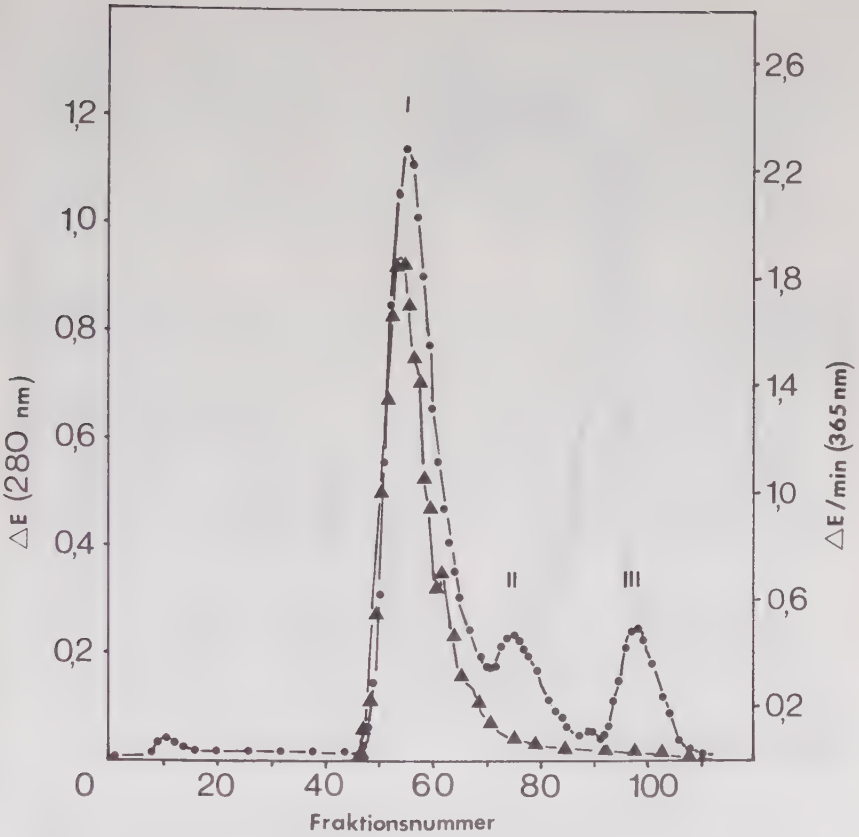


Abb. 38: DEAE-Sephadex-A50-Chromatographie der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis*; elektronenmikroskopische Untersuchung der Proteinpeaks

—•—•— Proteinkonzentration

—▲—▲— Enzymaktivität

Das Verhältnis der Formen in den einzelnen Proteinpeaks:

	I	II	III
Y	9,5%	8,9%	5,4%
◉	87,5%	86,5%	44,5%
△	3 %	4,6%	50,1%

Durchführung der Chromatographie s. Legende zu Abb. 39.

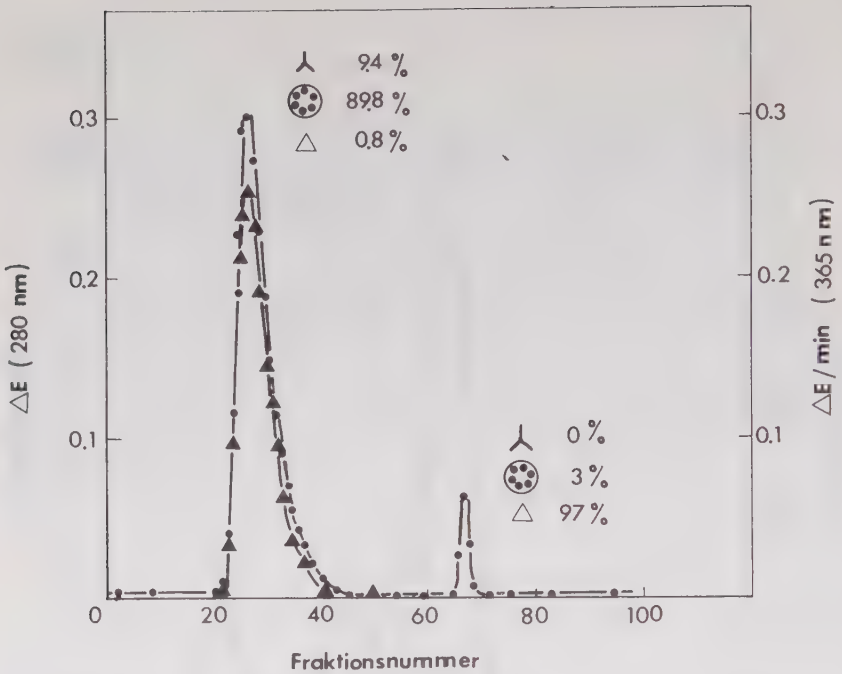


Abb. 39: Rechromatographie des Proteinpeaks I aus Abb. 38 an Sephadex-A50

Das Enzym wurde mit einem linearen Gradienten von 100 mM KPO_4, pH 7,0 + 100 mM KCl + 3 mM $MgCl_2$ und 100 mM KPO_4, pH 7,0 + 750 mM KCl + 3 mM $MgCl_2$ eluiert. Säulendurchmesser: 1,5 x 30 cm.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen betrug der Proteingehalt der Proben 80-100 µg/ml.

—•—•— Proteinkonzentration

—▲—▲— Enzymaktivität

Die Symbole sind: ⅄ = Stern, ◎ = Ring, △ = Dreieck.

Es wird das Verhältnis der drei Formen in den Proteinpeaks angegeben.

SDS-Elektrophorese ließ nur eine Proteinbande erkennen, die der Bande für die große Untereinheit der Citrat-Lyase mit einem Molekulargewicht von 53 500 entsprach. Ein Masseverlust würde auch das Auftreten des schmalen Proteinpeaks nach dem Hauptpeak erklären, da an DEAE-Sephadex-A50 nicht nur nach Ionisationszustand, sondern auch nach Molekülgröße getrennt wurde.

Der Hauptpeak enthielt Ringe, Sterne und Dreiecke im üblichen Verhältnis. Da eine wiederholte Auftrennung des Hauptpeaks möglich war, konnte daraus geschlossen werden, daß sich die inaktive Dreieckstruktur aus Ring- und Sternform nachbildete. Eine Trennung der Ring- von der Sternform war durch Chromatographie nicht möglich gewesen. Das Verhältnis hatte sich nicht verändert, auch wenn die Fraktionen des höchsten Aktivitätspeaks einzeln untersucht wurden.

4.2.4. Änderung des Verhältnisses der im Gleichgewicht stehenden Ring- und Sternform durch a. Inkubation der Citrat-Lyase mit ihrem Substrat Citrat

In zahlreichen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der aktiven und inaktiven Citrat-Lyase und des reaggregierten Enzyms war das Verhältnis von Ring- und Sternform immer gleich geblieben (~ 86-89% und 11- 7%), und es war nicht möglich gewesen, Ringe und Sterne voneinander zu trennen. So konnte angenommen werden, daß beide Formen im Gleichgewicht miteinander standen.
Die Frage, welche Form die katalytisch aktive des Enzyms darstellte, sollte beantwortet werden. Durch Zusatz von Substrat, sollte versucht werden, eine Veränderung des Verhältnisses zu erzielen, da sich die durch Substratumsatz erfolgende Reaktion in einer Konfigurationsänderung äußern könnte.

Die Experimente wurden bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen durchgeführt in einem Bereich von 100 - 1000 µg/ml =

0,55 - 2,3 E/ml. Ein Vergleich der EM-Präparationen und Auszählen der Moleküle war möglich, da bei zunehmender Proteinkonzentration die Adsorptionszeit für die Negativ-Kontrastierung entsprechend herabgesetzt wurde.

Die Substratkonzentration wurde variiert von 0,005 - 10 mM Citrat oder Mg/Citrat pro Ansatz. Adsorbiert wurde jeweils nach einer Inkubationszeit mit Citrat sofort nach dem Mischen, nach 5 und 15 Minuten.

Der Nullwert ohne Substrat wurde pro Versuch bestimmt,und der Mittelwert aus 13 Versuchen betrug für die Sternform = 8,7%, die Ringform = 88,6% und die Dreieckform 2,7%. Bei wenigen Enzympräparationen betrug der Prozentsatz an Sternen allerdings 4,3% und der der Dreiecke 5,85%. Der anfänglich hohe Wert von 5,85 an Dreiecken reduzierte sich nach längerer Aufbewahrung auf 1,3, der Anteil an Bruchstücken im elektronenmikroskopischen Bild nahm entsprechend zu. Innerhalb der folgenden Versuche wurde zur besseren Übersicht der Prozentsatz der Dreiecke nicht angegeben, da sie im Verhältnis von Ring- und Sternform keine Rolle spielten.

Es war äußerst schwierig, eine Veränderung des Verhältnisses von Ring- und Sternform nachzuweisen, da sich die drei Parameter Protein-, Substratkonzentration und Inkubationszeit gegenseitig beeinflußten.

Tab. 17 gibt einen Überblick über die Abhängigkeiten. Bei den Angaben handelt es sich um Mittelwerte aus 7 Versuchen. Zur besseren Übersicht sind die Versuche zur Zeitabhängigkeit nicht mit aufgeführt. Es waren für jede Substratkonzentration sofort nach Citrat-Zugabe nach 5 und 15 Minuten Proben entnommen und verglichen worden. Eine Erhöhung der Sterne konnte nur sofort nach Substratzugabe (1 mM) oder bei niedriger Citratkonzentration (0,5 mM) innerhalb der ersten Minuten gemessen werden, während sich nach 15 Minuten Inkubation das alte Gleichgewicht

Tab. 17: Veränderung des Verhältnisses von Stern- und Ringform nach Inkubation mit dem Substrat Citrat

Substratkonzentration Citrat (mM)	% Sternanteil bei unterschiedlicher Enzymkonzentration (115 µg/ml)	(230 µg/ml)	(575 µg/ml)	(980 µg/ml)
50	7.8	7.95	7.63	8.15
10	7.5; 20.5	8.95	8.3	8.82
6	7.5	7.3	8.1	7.8
5	7.4	11.44	9.64	9.32
4	7.5	7.25	7.5	7.6
2	7.3	7.5	7.8	7.8
1	20.3; (22.4)	19.5	35.8	33.4
0.6	7.5	7.45	7.62	7.95
0.5	8.5; (10.6)	8.45	20.4	8.1
0.4	7.35	7.4	7.9	7.8
0.1	7.07	10.4	8.58	8.45
0.005 - 0.05	8.6	7.95	8.3	8.25

Sofort nach Citratzugabe wurde für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen adsorbiert. Die in Klammern angegebenen Werte sind Beispiele für 5 min Inkubationen. Das Testvolumen für die EM-Präparationen betrug 0.1 ml. Die Proteinkonzentrationen entsprachen folgenden Aktivitäten: 115 µg/ml = 0.27 E/ml
230 µg/ml = 0.55 E/ml
575 µg/ml = 1.37 E/ml
980 µg/ml = 2.29 E/ml

Durchführung siehe METHODEN; Interpretation siehe Text.

Der zweite Wert für 10 mM Citrat bei 115 µg/ml gibt einen Ausnahmewert an.

wieder einstellte. Das Substrat schien umgesetzt worden zu sein.

Eine eindeutige Erhöhung der Sternanzahl konnte nur für die Citratkonzentration von 1 mM für alle getesteten Enzymkonzentrationen nachgewiesen werden. Zum Beispiel war für die Enzymkonzentration von 575 µg/ml = 1,37 E/ml am meisten erhöht worden, und zwar um den Faktor 4,5. Für dieselbe Proteinkonzentration betrug der Faktor nur 2,5 bei einer Substratkonzentration von 0,5 mM Citrat. Die Andeutung einer Erhöhung war bei 5 mM zu erkennen, für 10 mM konnte nur einmal bei 115 µg/ml ein höherer Wert erzielt werden. Eine Veränderung des Verhältnisses von Ring und Stern war also nicht bei allen Substratkonzentrationen möglich. Eine weitere Erhöhung konnte nicht erreicht werden, wenn anstelle von Citrat das Substrat Mg/Citrat verwendet wurde.

b) Inkubation mit Citratanalogen

In der Annahme, daß sich der Prozentsatz an Sternen während des Substratumsatzes verändert, sollte versucht werden, die Sternanzahl noch mehr zu erhöhen oder den vermehrten Sternzustand für längere Zeit zu stabilisieren. Da das Substrat Citrat während der Reaktion eventuell so schnell umgesetzt wurde, daß eine Erhöhung der Sterne nicht mehr nachweisbar war, sollten Citratanaloge zur Inkubation verwendet werden.

Die Citratanalogen waren: Fluorcitrat, Isocitrat und Tricarballylat (Testvolumen für EM-Präparationen: 0,1 ml). Inkubiert wurde von 0.01 mM - 50 mM des Substratanalogen in einer Zeit von 0-15 Minuten bei unterschiedlicher Enzymkonzentration von 100-1000 µg/ml.

Parallel zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde die Einwirkung der Substratanalogen auf die Enzymaktivität

gemessen. Fluorcitrat und Isocitrat hatten keinen Einfluß. Tricarballylat hemmte bei einer Konzentration von 1 mM zu 10,2% die Aktivität des Enzyms, von 10 mM bereits 63,5%, und bei 50 mM betrug der Aktivitätsverlust 96%. In Abb. 40 ist die Hemmung in Abhängigkeit von der Konzentration graphisch dargestellt.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen die Wirkungslosigkeit von Fluorcitrat und Isocitrat, da keine Veränderung im Verhältnis von Ring- und Sternform festgestellt werden konnte. Nur die Versuche mit Tricarballylat waren positiv. Abb. 41 ist ein deutliches Beispiel für vermehrte Sternbildung nach Inkubation mit Tricarballylat.

Tab. 18 gibt die Ergebnisse wieder, die sofort nach Substratanalogzugabe gemessen wurden. Zur besseren Übersicht sind die gemessenen Werte für die 5 und 15 min Inkubation nicht mit aufgeführt. Bei Inkubation mit Tricarballylat im Bereich von 1-10 mM konnte eine Erhöhung des Sternanteils sofort nach Zugabe gemessen werden, während nach weiterer Inkubation sich die Sterne wieder verringerten. Bei niedrigeren Substratanalogkonzentrationen (unterhalb von 1 mM) lag eine erhöhte Sternanzahl mit steigenden Enzymkonzentrationen nach immer längerer Inkubationszeit vor (max. 15 min).

Aus Tab. 18 ist ersichtlich, daß die Zugabe von 50 mM Substratanalog die Enzymmoleküle sofort zerstörte. Aus den weiteren Werten geht hervor, daß bei Inkubation mit Tricarballylat im Gegensatz zu Citrat eine Erhöhung der Sternform über alle gemessenen Konzentrationsbereiche (0.01-10 mM) eintrat. Für den Versuch waren hauptsächlich die Konzentrationen gewählt worden, bei denen sich bei der Citratinkubation eine Erhöhung angedeutet hatte.

Die Anzahl der Sterne war nicht überall gleich hoch. Sie war außer der Substratanalogkonzentration auch abhängig von

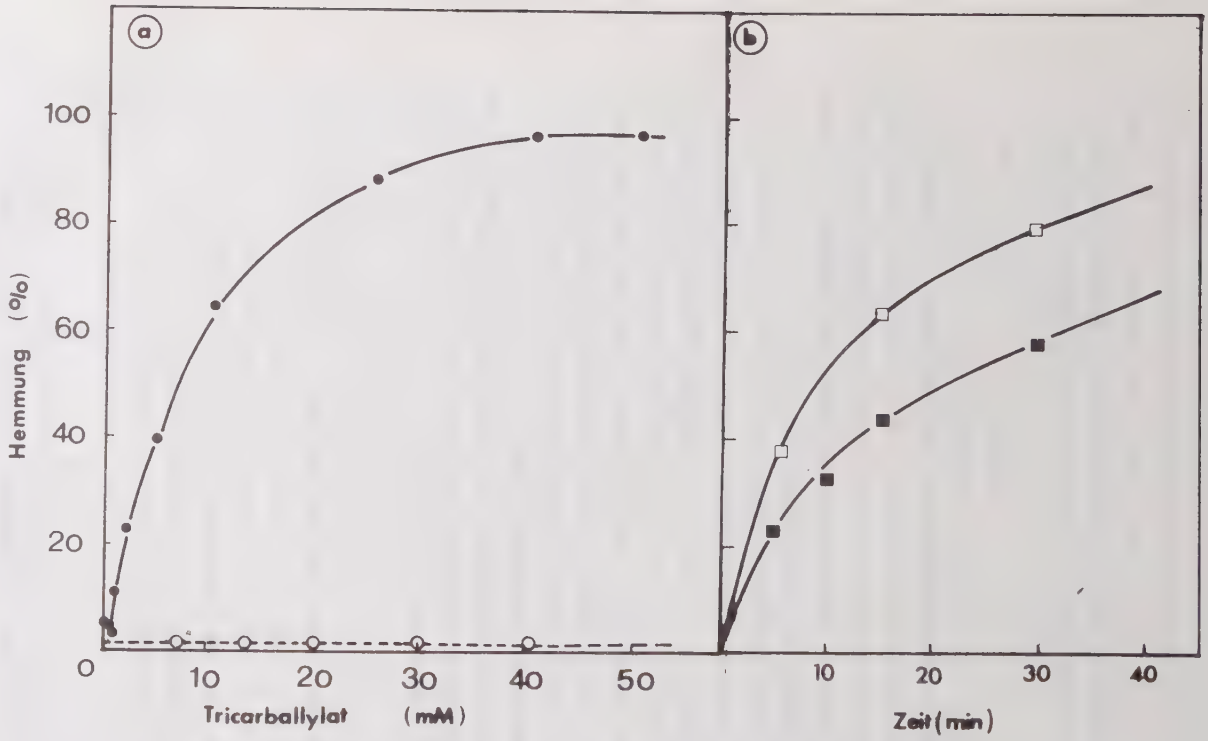


Abb. 40a + b: Hemmung der Citrat-Lyase-Aktivität durch Inkubation des Enzyms mit Tricarballylat

a) —●—●— Tricarballylatkonzentration; Inkubationszeit/Ansatz: 15 min
—○—○— zum Vergleich: Inkubation mit Fluorcitrat oder Isocitrat

b) Hemmung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit
—■—■— 5 mM Tricarballylat im Testansatz
—□—□— 10 mM Tricarballylat im Testansatz

Abb. 41: Vermehrte Sternbildung nach Inkubation mit Tricarballylat

Vergrößerung: EM-Vergr. 25 000 x Nachvergr. 4,5 = Endvergr. 110 000

1 mm $\hat{=}$ 91 Å

Tricarballylatkonzentration: 0,5 mM

A = Ring

B = Stern

BG = Background

Tab. 18: Veränderung des Verhältnisses von Ring- und Sternform nach Inkubation mit dem Citratanalog Tricarballylat

Substratkonzentration Citrat (mM)	% Sternanteil bei unterschiedlicher Enzymkonzentration (115 µg/ml)	(230 µg/ml)	(575 µg/ml)	(980 µg/ml)
50	nur Bruchstücke			
10	21.9 o. 8.3	42.8 o. 28.4	14.2	9.9
5	17.2	5.4	34.0	25.8
1	13.6	41.4	29.6	30.6
0.5	13.5; (16)	21.2	24.4	9.6
0.1	12.8	20.6	12.8	-
0.01	12.2	19.8	16.7	-

Legende siehe Tab. 17. Bei der Konzentration von 10 mM Tricarballylat sind ebenfalls die zum gleichen Prozentsatz erhaltenen niedrigeren Werte angegeben.

der Proteinkonzentration. Bei einer Enzymkonzentration von 230 µg/ml = 0.55 E/ml war die Erhöhung über alle Bereiche am deutlichsten. Bei dieser Proteinkonzentration folgte einer Zunahme der Substratanalogkonzentration eine Begünstigung der Sternbildung.
Parallel zur Citratinkubation konnte bei einer Tricarballylatkonzentration von 1 mM bei allen Proteinkonzentrationen eine Erhöhung der Sternanzahl verzeichnet werden. Eine Verfünffachung des Normalwertes für die Sterne wurde bei einer Enzymkonzentration von 234 µg/ml gemessen. Die bedeutete, daß auch nach Inkubation mit dem Citratanalogen Tricarballylat kein wesentlich höherer Prozentsatz an Sternen als nach Citratinkubation erzielt werden konnte.

Eine Interpretation der erhaltenen Werte sowie die Beantwortung der Fragen, ob die Zuordnung einer Form als aktives Enzym möglich ist, in welcher Beziehung die Formen zu den "bumpy curves" in der Substratsättigungskurve stehen können, d. h. inwieweit sich eine Affinitätsänderung vom Substrat zum Enzym in der Quartärstruktur äußern kann, wird in der Diskussion gegeben werden.

Um weitere Erkenntnisse über die Einwirkung des Substratanalog Tricarballylat auf die Citrat-Lyase zu gewinnen, wurde dem durch Harnstoffinkubation dissoziierten Enzym während der Reaggregation 0.5 mM Tricarballylat zugesetzt. Vom Zeitpunkt der Harnstoffverdünnung wurde der Anstieg der Aktivität sowie die Ausbildung der intakten Enzymmoleküle verfolgt. Es bestätigte sich die Annahme, daß unter diesen Bedingungen die Ausbildung der Sternform begünstigt wurde, da das Substratanalog direkt die Untereinheiten angreifen konnte. Nach 30 min lagen die Sterne zwar zu 81% vor, jedoch war der Anteil der reaggregierten Moleküle zu gering, um eine aussagekräftige Interpretation zu geben.

DISKUSSION

Der Multienzymkomplex: Citrat-Lyase

I. Interpretation seiner Aktivitäten

Ein Multienzymkomplex wird als Aggregat verschiedener, funktionell in Beziehung stehender Enzyme definiert, die durch nichtkovalente Bindungen zu einer höher organisierten Struktur zusammengehalten werden. Das Wirkungsprinzip dieser Komplexe, die eine über mehrere Schritte verlaufende Reaktionsfolge katalysieren, besteht darin, die Zwischenprodukte durch Transfer-Reaktionen von Enzym zu Enzym weiterzugeben. Die verschiedenen, bisher untersuchten, löslichen Enzymkomplexe konnten Auskunft geben über die Wirkung von makromolekularer Organisation bei der Regulation in biologischen Systemen. Anhand von Beispielen, wie z.B. der Fettsäure-Synthetase (LYNEN, 1961, 1964, 1967, 1968; GOLDMAN et al. 1963), verglichen GINSBURG und STADTMAN (1970) die höhere Wirksamkeit der Komplexe gegenüber ihren isolierten Komponenten.

In die Reihe der Multienzymkomplexe ist das katabolische Enzym, die Citrat-Lyase, einzuordnen, die ähnlich der Isocitrat-Lyase (DIMROTH et al., 1975c)eine Aldolreaktion katalysiert. Isocitrat-Lyase unterscheidet sich jedoch im Aufbau und in den durch das Enzym katalysierten Teilreaktionen von der Citrat-Lyase (BUCKEL et al., 1971), die aus drei verschiedenen Untereinheiten besteht; eine davon ist ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) mit Phosphopantothein als Wirkungsgruppe (BUCKEL und EGGERER, 1972; DIMROTH et al., 1973).

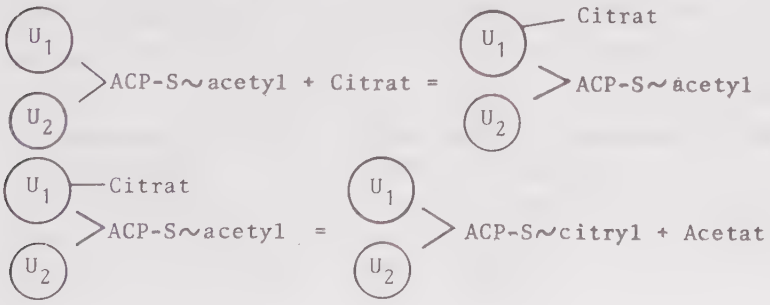
Im aktiven Zustand ist das Acyl-Carrier-Protein der Citrat-Lyase acetyliert. Liegt das ACP mit freier SH-Gruppe oder carboxymethyliert vor, so ist das Enzym inaktiv. In Gegenwart von Acetyl-CoA konnten diese inaktivierten Enzymarten jedoch die Spaltung von Citrat (Gleichung 4 und 5) über die intermediäre Bildung von 3 S-Citryl-CoA (BUCKEL et al., 1973) katalysieren, analog zur normalen Citrat-Lyase-Reaktion.

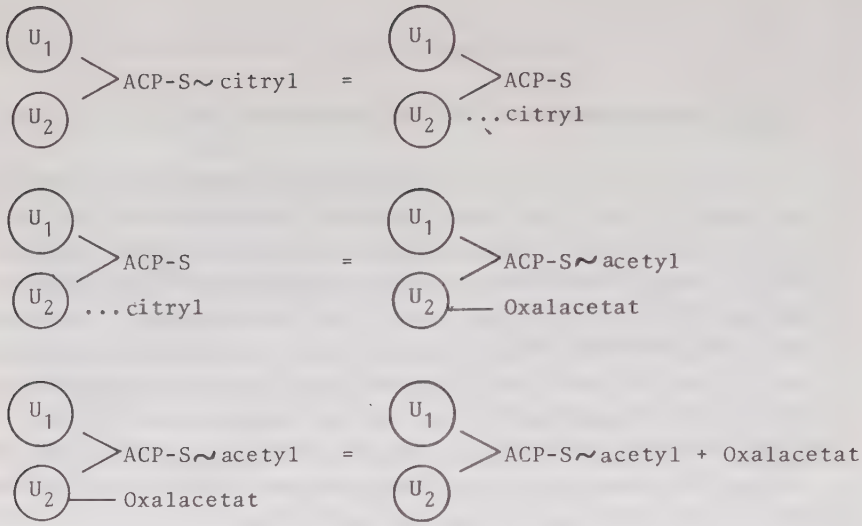
Acetyl-CoA + Citrat $\rightleftharpoons$ Citryl-CoA + Acetat (4)

Citryl-CoA $\rightleftharpoons$ Acetyl-CoA + Oxalacetat (5)

In diesem System übernahm Acetyl-CoA die katalytische Funktion des Acetyl-S-ACP. Daß Acetyl-CoA und Citryl-CoA für die nativen enzymatischen Zwischenprodukte (Acetyl-S-ACP und Citryl-S-ACP) standen, wurde auch durch die strukturelle Ähnlichkeit der prosthetischen Gruppe des ACP mit CoA begründet. DIMROTH und EGGERER (1975a)erbrachten in ihren Untersuchungen den Beweis eines intermediären Citryl-S-Acyl-Carrier-Proteins. Sie klärten die Frage, ob es sich bei den beobachteten Teilreaktionen während der Citratspaltung um die Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten handelte, oder ob eine Katalyse nur in ihrer Verbindung zum Komplex möglich war.

Danach konnten nach Dissoziation der Citrat-Lyase das ACP (MG~10 000) und zwei weitere Untereinheiten (MG 54 000 und 32 000) rein und in katalytisch aktivem Zustand isoliert werden. Die isolierten Einzelproteine zeigten keinerlei Citrat-Lyase-Aktivität. Erst nach Mischen der drei Proteinkomponenten wurde in zeitabhängiger Reaktion katalytisch aktive Citrat-Lyase zurückgebildet. Die größte Untereinheit katalysierte den Acylaustausch in Gegenwart von ACP, die zweitgrößte die Lyasereaktion, während das Acyl-Carrier-Protein den Transport der Acylreste (Acetyl-S-ACP und Citryl-S-ACP) zwischen den beiden verschiedenen Enzymen im nativen Komplex vermittelte:





Eine solche Reaktionsfolge ermöglichte einen fortlaufenden Substratumsatz unter Regeneration des Acyl-S-Enzyms.

Citryl-CoA wurde weder vom zweitgrößten Protein (Lyase) noch von einer anderen Untereinheit gespalten. Es war ein Mischen der beiden großen Untereinheiten notwendig, wodurch möglicherweise die Lyase erst durch Komplexbildung mit der Transferase, also durch Protein-Protein-Wechselwirkung, in die katalytisch aktive Konformation gebracht wurde. Durch die Beobachtung, daß die katalytische Aktivität der Transferase 100fach geringer war als in der Gesamtreaktion, wurde bewiesen, daß erst durch das Zusammenwirken der Untereinheiten im Komplex die katalytische Aktivität des katabolischen Enzyms optimal war.

Citrat-Lyase kann als einfachster pantothenatenthaltender Enzymkomplex angesehen werden. Obwohl andere Multienzymkomplexe wie Gramicidin S-Synthetase (LIPMANN, 1973), 6-Methylsalicylsäure-Synthetase (DIMROTH et al., 1972) und die Fettsäuresynthetasen (LYNEN et al., 1968; PRESCOTT et al., 1972) ebenfalls Pantothenat enthalten, unterscheiden sie sich doch durch ihre

Proteinzusammensetzung von der Citrat-Lyase, so daß die Citrat-Lyase mehr den bakteriellen Biotinenzymen Acetyl-CoA-Carboxylase (LANE et al., 1974) und Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase (WOOD et al., 1975) gleicht. Diese Enzyme katalysieren ähnlich wie die Citrat-Lyase eine zweistufige Reaktionsfolge und sind ebenfalls aus einem Carrierprotein und zwei unterschiedlichen Enzymen zusammengesetzt, die isoliert werden konnten.

Die aufklärenden Untersuchungen über den Reaktionsmechanismus waren an dem Enzym des Enterobakteriums *Klebsiella aerogenes* durchgeführt worden. Inzwischen ist für die Citrat-Lyase aus dem phototrophen Bakterium *Rhodopseudonomas gelatinosa* (BEUSCHER et al., 1974) und dem Milchsäurebakterium *Streptococcus diacetilactis* (KÜMMEL et al., 1975; SINGH und SRERE, 1975) nachgewiesen worden, daß die Katalyse nach einem ähnlichen Prinzip verläuft. Das Enzym aus *S. diacetilactis* verlor durch Hydroxylaminolyse oder DTE-Inkubation seine Aktivität, die durch chemische Acetylierung mit Acetanhydrid oder Acetyl-Imidazol wiedererhalten wurde. Vorinkubation der Citrat-Lyase mit DTE nach der Hydroxylaminolyse ergab eine höhere Reaktivierung und dokumentierte ebenfalls die Beteiligung einer Thioestergruppe am Reaktionsprozeß. Die enzymatische Spaltung von [1,5-^{14}C] -Citrat führte zu einer Beladung des Enzyms mit einer kovalent gebundenen ^{14}C-Verbindung, während eine Beladung nach Inkubation mit [6-^{14}C]-Citrat fehlte. Diese Ergebnisse entsprachen den für *K. aerogenes* erzielten Werten.

In einem Punkt unterschied sich jedoch die Lyase der Milchsäurebakterien *S. diacetilactis* und *L. citrovorum* von den Enzymen aus *K. aerogenes, E. coli* und *R. gelatinosa*:sie unterlag nur einer geringen "Reaktionsinaktivierung". Das rasche Abklingen der Citrat-Lyase-Reaktion war von WHEAT und AJL (1955b) als Oxalacetathemmung interpretiert worden, konnte jedoch von SINGH und SRERE (1971) als eine Enzyminaktivierung erklärt werden, die nur während des Reaktionsablaufs auftrat. Das als

"suicide" benannte Phänomen war abhängig von divalenten Metallionen. Nach Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Citrat-Lyase wurde klar, daß diese Inaktivierung auf einer Hydrolyse des intermediären Citryl-S-Enzyms beruhte:

$$\text{E-S}\sim\text{Citryl} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}} \text{ESH} + \text{Citrat}$$

Entgegen unseren Untersuchungen (KÜMMEL et al., 1975) an der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* hatten SINGH et al. (1975) eine Reaktionsinaktivierung durch Reduzierung der Enzymmenge und Erhöhung der Reaktionszeit erzielt, die 1/10 der für *K. aerogenes* gemessenen Werte betrug. Erst unter extremen Bedingungen wie Inkubation mit Harnstoff, Jodacetat, DTE, ATP etc. konnte eine vergleichbar geringe Reaktionsinaktivierung in unseren Versuchen festgestellt werden. Die Tatsache, daß die ausgeprägte Reaktionsinaktivierung bei *K. aerogenes* und *R. gelatinosa* durch Zunahme der Ionenkonzentration verringert werden konnte, zeigt die Möglichkeit der Beeinflussung dieses Phänomens.

Im übrigen besteht für die Milchsäurebakterien auch nicht die Notwendigkeit, die Citrat-Lyase unter bestimmten Bedingungen zu inaktivieren, da ihnen das antagonistische Enzym Citrat-Synthase fehlt. Sie sind auf Glutamat im Nährmedium angewiesen, und ihre acetylierte Citrat-Lyase, die auch im citratfreien Medium aktiv bleibt, stört keine anderen Stoffwechselreaktionen. Die Notwendigkeit, die Lyase zu inaktivieren, besteht aber bei den Enterobakterien und *R. gelatinosa*, da sie über die Citrat-Synthase verfügen. In Abwesenheit von Citrat müssen sie Glutamat aus Acetyl-CoA und Oxalacetat über Citrat synthetisieren, so daß in Gegenwart einer aktiven Citrat-Lyase ein "futile cycle" existieren würde. Bei *R. gelatinosa* konnte eine Inaktivierung in vivo nach Verbrauch von Citrat im Medium nachgewiesen werden. Die Regulation der Citrat-Lyase-Aktivität erfolgte in diesem Fall durch eine enzymkatalysierte Desacetylierung des aktiven Enzyms (GOTTSCHALK et al., 1974), wo-

bei die spezifische Desacetylase wiederum durch Glutamat gehemmt wurde (GIFFHORN und GOTTSCHALK, 1975b) Die hohe Spezifität der Citrat-Lyase-Desacetylase von *R. gelatinosa* drückte sich in dem Unvermögen aus, die Acetyl-S-Enzyme von *K. aerogenes* oder *S. diacetilactis* zu inaktivieren.

In der Anpassung der Citrat-Lyase an die unterschiedlichen Stoffwechselsituationen durch den Übergang $CL_{aktiv} \rightleftharpoons CL_{inaktiv}$ liegt ein biologischer Regelvorgang vor. Die chemische Enzymmodifikation als Prinzip der metabolischen Regulation der Enzymaktivität ist in einigen Fällen gut untersucht, wie z. B. bei der Glykogen-Phosphorylase und -Synthetase vieler Eukaryonten (CORI et al., 1943; VILLAR-PALASI et al., 1960) oder der Glutamin-Synthetase in *E. coli* (MECKE et al., 1966).

Unter dem Aspekt der Regulation durch Acetylierung und Desacetylierung galt es, außer einem inaktivierenden Enzymsystem auch ein aktivierendes nachzuweisen. SINGH et al. (1973) beschrieben ein acetylierendes Enzym ("Transferase") aus *K. aerogenes*, welches eine Acetyl-Gruppe vom Acetyl-S-Phosphopantothein auf desacetylierte Citrat-Lyase übertrug. SCHMELLENKAMP und EGGERER (1974) widerlegten diese Arbeit. Sie wiesen die enzymatische Acetylierung der Citrat-Lyase nach folgender Gleichung nach:

$$\text{Acetat} + \text{ATP} + \text{Desacetyl-CL} \longrightarrow \text{Acetyl-CL} + \text{AMP} + PP_i$$

Bei den Versuchen zur Acetylierung von Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* ergab sich eine vollkommen neue Perspektive als beobachtet wurde, daß angereicherte inaktive Citrat-Lyase in Anwesenheit von ATP und Acetat ohne Zusatz von weiteren Komponenten reaktiviert wurde. Dieses Ergebnis konnte nur bedeuten, daß sich die acetylierende Aktivität noch im Präparat der hoch angereicherten Citrat-Lyase befand.

Im Gegensatz zu der Acetat: SH-Enzym-Ligase aus *K. aerogenes* konnte das acetylierende Enzym in *S. diacetilactis* nicht von

der Citrat-Lyase getrennt werden. Im Anreicherungsprozeß erfolgte eine parallele Zunahme der spezifischen Aktivitäten der Citrat-Lyase sowie des acetylierenden Enzyms. Der Nachweis eines homogenen Präparates durch Disk-Elektrophorese und Ultrazentrifugation schien die Vermutung zu bestätigen, daß das acetylierende Enzym mit der Citrat-Lyase assoziiert war und somit einen Teil des Multienzymkomplexes darstellte.

In weiterführenden Versuchen gelang es jedoch (BOWIEN und GOTTSCHALK, pers. Mitt.), die Ligase von der Citrat-Lyase zu trennen. Eine Trennung erfolgte nur, wenn die Zellen von *S. diacetilactis* durch Behandlung mit der French-Presse aufgeschlossen worden waren und wenn durch Zugabe von ATP und Acetat zum Rohextrakt dafür gesorgt wurde, daß die Lyase vollständig acetyliert war. Dies würde bedeuten, daß die Ligase eine hohe Affinität zum SH-Enzym besitzt und daß bei einer Assoziation in vivo bisher immer ein Teil der Citrat-Lyase als SH-Enzym vorgelegen haben muß. Innerhalb eines Teils von Anreicherungsprozessen war zuvor festgestellt worden, daß bei Zunahme der oxidierten Stellen - die durch Inkubation mit DTE reduziert und mit Acetyl-Imidazol chemisch acetyliert werden konnten - eine Abnahme des acetylierenden Enzyms bis zu 30% erfolgt war. Jedoch konnte keine Erklärung dafür gefunden werden, warum bei einem anderen Teil von Anreicherungen der Level an acetylierendem Enzym im Rohextrakt und im angereicherten Präparat gleichgeblieben war. Eine Erklärung für die Assoziation durch eine hohe Affinität zum SH-Enzym wurde auch im Verhalten der Ligase sichtbar, die, assoziiert mit ihrer Citrat-Lyase, in der Lage war, desacetylierte Citrat-Lyase ohne Ligase zu aktivieren.

Unabhängig von der Isolierung der Ligase von der CL konnte die Spezifität des acetylierenden Enzyms aus *S. diacetilactis* gegenüber seinem Substrat dokumentiert werden. Das Enzym war nicht in der Lage, die SH-Citrat-Lyase von *K. aerogenes* und *R. gelatinosa* zu acetylieren, während SCHMELLENKAMP (1974) für das acetylierende Enzym aus *K. aerogenes* keine ausschließliche Spe-

zifität nachgewiesen hatte. Bei Ersatz von ATP durch andere Adenylate erfolgte keine Acetylierung. ATP und Acetat konnten jedoch durch chemisch synthetisiertes Acetyl-adenylat ersetzt werden, dessen Konzentration wesentlich höher liegen mußte als die der natürlichen Substrate. Demnach konnte freies Acetyl-adenylat als Intermediärprodukt ausgeschlossen werden. Das Vorhandensein von enzymgebundenem Acetyl-adenylat war nicht ausgeschlossen. In Analogie dazu standen die Untersuchungen von BERG (1956) über den Reaktionsmechanismus der Acetat:CoA-Ligase, bei dem Enzym-(Adenylat) als Intermediärprodukt der katalysierten Reaktion auftrat.

Neben dem Problem der Bindung der Substrate an das acetylierende Enzym wurde auch die Frage nach dem Aktivierungsmechanismus der SH-Citrat-Lyase zu beantworten versucht. Der sich an einem Multienzymkomplex anspielende Mechanismus könnte in Analogie zu dem der cyclischen Decapeptid-Antibiotica-Biosynthese stehen. Die Komplexe von Gramicidin S und Tyrocidin-Synthetasen (KLEINKAUF et al., 1969, 1971; LEE et al., 1973) enthalten Enzymaktivitäten, die die Aminosäuren durch anfängliche Aktivierung mit ATP nichtkovalent als Aminoacyl-Adenylate am Enzym binden und sie anschließend zu einer kovalent gebundenen SH-Gruppe überführen. Das Unvermögen (außer bei Phenylalanin), eine ATP-AMP-Austauschreaktion zu katalysieren, hatte gezeigt, daß die Acetylgruppe irreversibel zu einem Akzeptor überführt wurde. Ebenso erfolgte keine Bindung der Aminosäuren in Abwesenheit von ATP, während eine Bindung von ATP, evtl. nicht spezifisch, in Abwesenheit von Aminosäuren möglich war. Ein Pantothein-enthaltendes Carrierprotein konnte isoliert werden (LEE et al., 1973). (Ein Transport von Acetylgruppen am Enzymkomplex kommt durchaus vor, wie z. B. bei der Fettsäuresynthetase (LYNEN, 1967), wo die Acylgruppen von natürlichen Thioestern zu enzymgebundenen SH-Gruppen überführt werden.)

Für den Citrat-Lyase-Komplex von *S. diacetilactis* wäre in Anlehnung an die Peptid-Antibiotica-Biosynthese demnach denkbar, daß ein schon enzymgebundenes Adenylmono- oder Adenyldiphosphat

mit Hilfe von freiem ATP zu einem Triphosphat phosphoryliert, mit Acetat acetyliert wird und ein anschließender Acetyltransport am Enzym zur reduzierten SH-Gruppe erfolgt, unter Bildung des aktiven Enzyms. Auch Acetat könnte zuerst gebunden werden. Dieser hypothetische Reaktionsablauf konnte nicht bestätigt werden. Eine Einwirkung von ATP auf das Enzym wurde deutlich, als nach Vorinkubation mit ATP sich die Reaktivierungsgeschwindigkeit erhöhte. Im weiteren Versuchsverlauf war jedoch zur Reaktivierung weiterer Zusatz von ATP erforderlich.

II. Strukturanalyse des Multienzymkomplexes

Bei der Bestimmung des Gesamtmolekulargewichtes für die gereinigte Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* mit Hilfe der Ultrazentrifugation wurde ein Wert von 540 500 erhalten, während SINGH und SRERE (1975) einen etwas höheren Wert von 585 000 beschrieben. Eine relativ gute Übereinstimmung war mit den entsprechenden Enzymen von *K. aerogenes* 575 000 (MAHADIK und SIVA RAMAN, 1968), 550 000 (BOWEN und MORTIMER, 1971), 560 000 (SINGH et al., 1974) und von *R. gelatinosa* 545 000 (BEUSCHER et al., 1974) zu verzeichnen.

Es bestand nicht nur eine Ähnlichkeit im Gesamtmolekulargewicht der Lyasen, sondern auch der Aufbau der Komplexe aus Untereinheiten wies eine bemerkenswerte Übereinstimmung auf. Die nach Inkubation mit Harnstoff oder SDS und DTE dissoziierte Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* wurde in der SDS-Elektrophorese in drei nicht identische Untereinheiten aufgetrennt. Die Molekulargewichte betrugen 53 500, 36 300 und 11 400. Obwohl

die Citrat-Lyase die Enzymaktivität für ihre eigene Acetylierung enthielt, unterschied sich die Anzahl der Untereinheiten nicht von der der angereicherten Citrat-Lyase von *K. aerogenes*, der das acetylierende Enzym fehlte (54 000, 32 000 und 11 000). BEUSCHER et al. (1974) hatten für die Citrat-Lyase von *R. gelatinosa* nur zwei Untereinheiten nachgewiesen (61 000 und 30 000), die sich somit durch das Fehlen der kleinsten Untereinheit (11 000) unterschied. In der SDS-Elektrophorese konnte jedoch mit gealtertem Enzympräparat eine schwache Bande für das kleinste Polypeptid bei *R. gelatinosa* entdeckt werden. Die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* mußte ebenfalls im Alterungsprozeß in weitere Untereinheiten zerfallen sein, da wesentlich mehr als drei Banden auftraten, unter die eventuell die abdissoziierte Ligase fiel.

Das molare Verhältnis von 1 : 1 der beiden großen Untereinheiten war für die Citrat-Lyase von *K. aerogenes* und *R. gelatinosa* durch quantitative Auswertung der Banden und auch durch Aminosäuresequenzanalyse bei *K. aerogenes* (SINGH et al., 1976) erhalten worden. Das molare Verhältnis für die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* betrug 0,8 : 1 (53 500 : 36 600). Im äquimolaren Verhältnis stand nach der Aminosäuresequenzanalyse auch die kleinste Untereinheit bei *K. aerogenes*, das Acyl-Carrier-Protein.

Phosphopantothenat war in allen drei Lyasen nachgewiesen worden. Während *R. gelatinosa* diese Verbindung in der Untereinheit mit dem MG: 30 500 enthielt, kam sie bei *K. aerogenes* im Acyl-Carrier-Protein vor. Eine Zuordnung zu einer Untereinheit war bei *S. diacetilactis* noch nicht erfolgt; da jedoch bei radioaktiver Markierung (SRERE et al., 1975) mit [1,5-^{14}C]-Citrat die gesamte Radioaktivität in der kleinsten Untereinheit erschien (11 000), könnte auch dieses Polypeptid als Träger des Phosphopantothenats und somit des aktiven Acetylrestes gelten.

In *K. aerogenes* wurde bewiesen (DIMROTH et al., 1973), daß das ACP der Fettsäuresynthetase nicht identisch war mit dem der

Citrat-Lyase. Das letztere trug bemerkenswerterweise zwei Sulfhydrylgruppen, die eine verkörpert durch einen Cysteaminrest, die andere durch einen Cysteinrest. Nur der Cysteaminrest des ACP wurde als Träger der Acetylgruppen erkannt (DIMROTH und EGGERER, 1975d).Die Funktion des ACP aus der Citrat-Lyase war durch das ACP der Fettsäuresynthetase nicht ersetzbar. Eine Übereinstimmung der beiden Acyl-Carrier-Proteine war nur in der Phosphodiesterbindung der prosthetischen Gruppe an das Protein zu finden, nicht in der Zusammensetzung und Struktur (DIMROTH, 1975b).Die prosthetische Gruppe der Lyase enthielt nicht nur Phosphopantothein, sondern auch Adenin, Phosphat und Zuckerreste und glich somit der Struktur von CoA. DIMROTH (1975b)und ROBINSON et al. (1976) hatten sich mit der Analyse der prosthetischen Gruppe des ACP befaßt und charakterisierten es als "Isodephospho-CoA" oder als 3'-1"-(5"-phosphoribosyl)dephospho-CoA.

Eine Katalyse der Spaltungsreaktion mit inaktiviertem ACP der Citrat-Lyase war in Gegenwart von Acetyl-CoA möglich gewesen (BUCKEL et al., 1973). ROBINSON et al. (1976) interpretierten nun die Existenz von 6 Mol Acyl-Carrier-Protein/Mol Enzym aber nur 4 Mol Pantothein/Mol Enzym mit der Möglichkeit, daß Acetyl-CoA in der Lage war, die zwei "leeren" ACP zu besetzen. Inwieweit diese Hypothese zutrifft, bleibt zu prüfen. Jedoch wäre aufgrund von Symmetrie- und Funktionsvorstellungen für das Enzym das Vorhandensein von sechs Acyl-Carrier-Proteinen zu fordern, da sowohl sechs Untereinheiten mit dem MG von 54 000 und sechs Untereinheiten mit dem MG von 32 000 existierten.

Der Nachweis einer hexameren Struktur der Citrat-Lyase wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zuerst am Enzym von *R. gelatinosa* (BEUSCHER et al., 1974) erbracht.

Bei den Untersuchungen an der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* war das Gewicht nicht auf die weitere Analyse der Untereinheiten gelegt worden, sondern auf die Interpretation der durch die Elektronenmikroskopie sichtbar gemachten Quartärstruktur dieses Enzyms. Die Assoziation des acetylierenden Enzyms mit der Citrat-Lyase, sowie die Unterschiede in Anzahl und Molekular-

gewicht der Untereinheiten waren im Vergleich zur Citrat-Lyase von *R. gelatinosa* interessante Gesichtspunkte gewesen.

Im hochgereinigten Enzympräparat der Citrat-Lyase waren im elektronenmikroskopischen Bild drei Formen erkennbar: "Ringe", "Sterne" und "Dreiecke", die im Verhältnis von ungefähr 86% zu 7-11% zu 0,5-3% zueinander standen. Die Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe der "Markham-Rotation" zeigte keine morphologischen Unterschiede zwischen den Ringen der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* und den Ringen von *R. gelatinosa*.

Danach bestand die Ringform der Lyase aus zwölf Untereinheiten, die in Form zweier hexagonaler Ringe um einen zentralen optisch leeren Raum angeordnet waren, wobei stets sechs Untereinheiten gleiche Größe hatten. Die Untereinheiten waren im Ring alternierend angeordnet; jeweils die kleinen und großen Untereinheiten lagen übereinander. In der Aufsicht hatte die nicht exakt ringförmige Struktur einen Durchmesser von 160 Å, während die Dicke der übereinanderliegenden Ringe in der Seitenansicht etwa 100 Å betrug. Die "Markham-Rotation" zeigte für die Sterne deutlich drei "Arme" und drei schwache Intensitätsmaxima zwischen den Hauptarmen. Die Dreiecke wurden durch eine innere und äußere Gruppe von Intensitätsmaxima gebildet, wobei beide Gruppen dreifache Rotationssymmetrie aufwiesen.

Da die Abmessungen, die allen drei Formen zugrunde lagen, wie Winkel, Durchmesser und Zentrum-zu-Zentrum-Entfernungen sehr ähnlich waren, konnte angenommen werden, daß es sich bei den Formen um ein- und dasselbe Enzymprotein handelte. Zuvor war ausgeschlossen worden, daß diese Formen eventuell gebildete Artefakte von Fixierungs- oder Färbemethoden waren.

Als weiterer Beweis konnte gelten, daß eine Übergangsform registriert wurde, die beide Charakteristiken aufwies, und zwar sowohl die der Ringe (alternierende zirkulär angeordnete Dichteverteilungen), als auch die der Sterne (Strukturen

ähnlich der "Arme", die in Winkeln von 120° zueinander angeordnet waren). Außerdem waren in der SDS-Elektrophorese nur drei Banden aufgetreten, entsprechend der Lyase aus *K. aerogenes*. 10% Fremdprotein wären durchaus nachweisbar gewesen. Würde es sich bei den Sternen und Dreiecken tatsächlich um Fremdprotein handeln, so müßten diese Formen Untereinheiten mit gleichen Molekulargewichten besitzen wie die der Citrat-Lyase (Ringe). Als Anhaltspunkt konnte gelten, daß Sterne ebenfalls in Citrat-Lyase-Präparationen aus *R. gelatinosa* in geringem Prozentsatz aufgetreten waren.
Durch das begrenzte Auflösungsvermögen der elektronenmikroskopischen Präparationsmethode war es nicht möglich gewesen, zwischen den Untereinheiten verschiedener Größe zu differenzieren. Die 11 000 Untereinheit bei *S. diacetilactis* war demnach gegenüber der Lyase von *R. gelatinosa* nicht nachweisbar.

In welcher Beziehung standen die drei Formen zueinander und welche Funktionen erfüllten sie?

Als ausgeschlossen konnte gelten, daß es sich bei der Sternform um das acetylierende Enzym handelt, da es für ein Regulationsprotein viel zu groß war und zu einem viel zu hohen Prozentsatz auftrat.
Von BOWIEN (persönliche Mitteilung) hergestellte Citrat-Lyase unterschied sich im elektronenmikroskopischen Bild nicht von den bisher untersuchten Präparaten mit Ligase enthaltenem aktivem Enzym aus *S. diacetilactis*. Weil die Acetat: SH-ACP-Enzym-Ligase (AMP) nicht in äquimolaren Mengen mit der Citrat-Lyase vorhanden war, bestand die Möglichkeit, daß das acetylierende Enzym in den bisher für die Elektronenmikroskopie hergestellten Präparaten nicht erfaßt worden war. Welche Struktur die Ligase hat, bliebe zu prüfen.

BEUSCHER et al. (1974) hatten die intakte Ringstruktur als die native Gestalt des enzymatisch aktiven Enzyms angenommen. Die Zuordnung einer entsprechenden Funktion bei den einzelnen Formen der Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* war schwierig, da kein elektronenmikroskopischer Unterschied zwischen

aktivem und inaktivem Enzym, d. h. acetyliertem, reduziertem und oxidiertem Zustand nachweisbar war. Das Verhältnis von Ring und Stern blieb konstant. VALENTINE et al. (1968) konnten bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen an der Glutamin-Synthetase aus *E. coli*, die dem Aufbau der Citrat-Lyase glich, keine Konformationsänderung zwischen den Zuständen "taut", "relaxed" und "tightened" feststellen. Die Zustände unterschieden sich in vitro durch Sedimentation und Viskosität.

Das Gelingen der Umwandlung von einer Form in die andere wäre bei *S. diacetilactis* ein weiterer Beweis für die Existenz von drei Formen für das Citrat-Lyase-Molekül gewesen.

Die Annahme, daß durch Dissoziation des CL-Moleküls in Untereinheiten und nachfolgender Reaggregation die Ausbildung einer Form begünstigt würde, konnte nicht bestätigt werden. Nach Inkubation mit Harnstoff dissoziierte die Citrat-Lyase zwar in Untereinheiten und war in der Lage, im Gegensatz zum Enzym aus *K. aerogenes* (DIMROTH et al.,1975a),durch Reduktion des Harnstoffgehaltes zu reaggregieren, jedoch blieb das Verhältnis von Ring zu Stern weiter konstant. Die Lyase war nicht nur visuell intakt, sondern zeigte auch wieder enzymatische Aktivität.

50% der Aktivität konnten bei vorheriger Behandlung mit DTE und nachfolgender chemischer Acetylierung zurückerhalten werden. Dies Verhalten bewies, daß das Acyl-Carrier-Protein während der Harnstoffinkubation teilweise desacetyliert und oxidiert wurde. DIMROTH et al. (1973) hatten nach Inkubation mit EDTA ein dissoziiertes, vollständig desacetyliertes Enzym aus *K. aerogenes* erhalten, das nach entsprechender Behandlung wieder reaggregieren konnte und reaktivierbar war.

Im reaggregierten Enzym war auch die Acetat: SH-Enzym-Ligase teilweise aktiv. Sie zeigte demnach dasselbe Reaggregationsverhalten wie das Substrat, die Citrat-Lyase. Im Gegensatz zur

Glutamin-Synthetase blieb die Citrat-Lyase im reaggregierten Zustand aktiv, was bewies, daß das reaggregierte Enzym dem nativen Enzym glich.

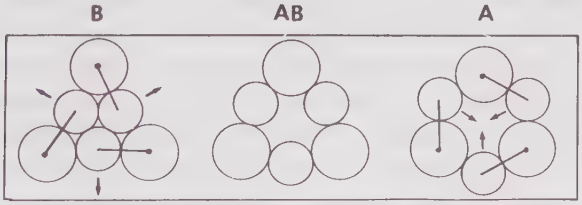
Während die optimale Reaggregation von verschiedenen Parametern abhing, wurde das Verhältnis von Ring- und Sternform durch die verschiedenen Versuchsbedingungen nicht beeinflußt. Die Dreieckstruktur trat in den reaggregierten Enzymlösungen nicht wieder auf, was entweder die Interpretation als Fremdprotein zuließ oder auf das Fehlen einer Funktion für die Aktivität der Citrat-Lyase hindeutete. Höchstwahrscheinlich stellte es jedoch die irreversibel inaktive CL dar, da das Dreieck nach längerer Inkubation und Aufbewahrung des reaggregierten Enzympräparates wieder auftrat. Die Nachbildung der Dreiecke mußte aus Ring und Stern erfolgen, da keine der beiden Formen sich verringerte.
Diese Hypothese konnte durch den Nachweis erhärtet werden, daß die durch Ionenaustauschchromatographie isolierte Dreieckstruktur keinerlei Aktivität aufwies. Bei Interpretation des Dreiecks als Fremdprotein hätte keine wiederholte Auftrennung in der Rechromatographie erfolgen dürfen.
SDS-elektrophoretische Auftrennung zeigte nur eine Bande, die der großen Untereinheit der Citrat-Lyase entsprach. Der damit bestätigte Masseverlust erklärte das Auftreten des Proteinpeaks für die Dreiecke nach dem Auftreten des Hauptpeaks in der Chromatographie. Das Vorhandensein von ausschließlich großen Untereinheiten ließ die Form eines Tetraeders vermuten, die dem Modell für die L-Glutamat-Dehydrogenase aus Ochsenleber glich (HORNE und GREVILLE, 1963).
Die Anwesenheit von irreversibel inaktiver Citrat-Lyase im hochgereinigten Enzympräparat ist verständlicherweise bedingt durch die Behandlungsmethode.

Es war nicht möglich gewesen, das Verhältnis von Ring ($\sim$ 86 %) und Stern (7-11 %) zu verändern oder die Formen voneinander zu trennen. Dies konnte nur bedeuten, daß Ring- und Sternstruktur im Gleichgewicht miteinander standen.

Welchen Zweck erfüllten aber die beiden Formen der Citrat-Lyase, war die Zuordnung einer Form als katalytisch aktive möglich? Wie könnte die energieaufwendige Umwandlung stattfinden?

Nach der Terminologie, definiert von MONOD et al. (1965), müßten heterologische Assoziationen zwischen den Untereinheiten der hexagonalen Ringe bestehen, während isologische Assoziationen zwischen den identischen Untereinheiten der aufeinanderliegenden Ringe herrschen müßten. Eine Vielzahl von nicht kovalenten Bindungen schützten die Stabilität sowie die Spezifität der Assoziationen.

Bei der Umwandlung der Formen - Ring und Stern - wurde angenommen, daß jeweils die heterologische Assoziation eines Paares im Ring bestehen bliebe und nicht alle heterologischen Assoziationen gelöst wurden. Durch eine Drehbewegung, deren Ausgangspunkt in der Mitte der großen Untereinheit lag, wurden die kleinen Untereinheiten ringeinwärts bewegt. Aufgrund der isologischen Bindungen erfolgten die Bewegungen synchron in beiden Ringen.



Entsprechend der Verteilung von Intensitätsminima und -maxima wurde die Form (AB) als Übergangsform erkannt.

Ein weiterer Versuch zur Änderung des Verhältnisses von Ring (A) und Stern (B) erfolgte unter dem Gesichtspunkt, daß sich ein Substratumsatz in einer Konfigurationsänderung äußern könnte.
Unter dem gleichen Aspekt der möglichen Effektor-induzierten

Konformationsänderung waren Versuche an der Glutamin-Synthetase (VALENTINE et al., 1968) durchgeführt worden, die jedoch negativ ausfielen.
Im Gegensatz dazu konnte bei Inkubation der Citrat-Lyase mit ihrem Substrat Citrat (Mg/Citrat) oder dem Citratanalogen Tricarballylat eine Veränderung des Verhältnisses von Ring und Stern erzielt werden. Die Formen waren zwar nicht vollständig ineinander überführbar, jedoch konnte eine Erhöhung der Sternstruktur maximal um den Faktor 5 erreicht werden. Durch Einsatz von Substratanalogen war versucht worden, den erhöhten Sternzustand zu stabilisieren oder noch weiter zu vermehren. Fluorcitrat und Isocitrat hatten sich als wirkungslos erwiesen; vermutlich beruhte dieses Verhalten auf sterischen Effekten. Eine deutliche Abhängigkeit der Hemmung der Citrat-Lyase-Aktivität von der Tricarballylatkonzentration war zu messen. Bei 96% Aktivitätsverlust in Gegenwart von 50 mM Tricarballylat lagen die Enzymmoleküle zerstört vor, wodurch die Einwirkung des Substratanalogen auf den Bindungsstatus der Untereinheiten dokumentiert wurde.

Die Abhängigkeit der erhöhten Sternbildung von der Substratkonzentration war der hervorstechendste Effekt dieser Untersuchungen. Bei der Konzentration von 1 mM war die deutlichste Erhöhung meßbar, sowohl für Tricarballylat als auch für Citrat. Bei Citrat konnte allerdings nur bei dieser Konzentration eine Veränderung erzielt werden. Eine Abnahme der erhöhten Sternanzahl und Einstellung des alten Gleichgewichtes nach längerer Inkubationszeit deutete einen Substratumsatz an. Die Abhängigkeit der Sternbildung von der Substratkonzentration ließ eine Verbindung zum kinetischen Verhalten der Citrat-Lyase in der Substratsättigungskurve herstellen, das zuerst einiger Erläuterungen bedarf.

III. Kinetisches Verhalten des Multienzymkomplexes

Bei der Bestimmung des K_m-Wertes für Citrat war bei der Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration ein hyperbolischer Kurvenverlauf bei niedrigem und ein mehrfacher Wechsel von hyperbolischen und sigmoiden Bereichen bei hohen Substratkonzentrationen aufgetreten. Der Übergang vom hyperbolischen zum sigmoiden Verlauf führte zu einer Kurve mit Zwischen-Plateau-Regionen.

Zum besseren Verständnis dieses Phänomens soll ein kurzer Überblick über die Beziehung von verschiedenen Arten von Substratsättigungskurven zu mehreren Arten von Kooperativität dienen.
Die Interpretation von kooperativen Effekten als Wechselwirkung zwischen Proteinuntereinheiten ließ mehrere Modelle entstehen (MONOD et al., 1965; ATKINSON et al., 1965, 1966;KOSHLAND et al., 1966), bei denen die Struktur der Untereinheiten zur Enzymfunktion in Beziehung gesetzt wurde. Eine Konformationsänderung durch positive Kooperativität, bei der durch Bindung eines Liganden die Bindung des nächsten begünstigt wird, erklärt die sigmoide Bindungskurve (BOHR, 1903).
Der umgekehrte Fall, bei der die Bindung des Substratmoleküls eine Konformationsänderung dahingehend bewirkt, daß die Bindung des zweiten Moleküls an der nächsten Untereinheit erschwert wird, wurde von CONWAY und KOSHLAND (1968) als negative Kooperativität bezeichnet. Der biologische Vorteil läge in diesem Fall, entgegengesetzt zu der positiven Kooperativität, in einer verringerten Sensibilität gegenüber Änderungen im umgebenden Milieu. Kinetische Eigenschaften des Enzyms können demnach durch entsprechende Veränderung der Untereinheiten ohne Mitwirken des aktiven Zentrums reguliert werden.

Mehrere Gründe, oder die Kombination derselben, können für die negative Kooperativität verantwortlich sein (LEVITZKI und KOSHLAND, 1969):

a) unterschiedliche Bindungskonstanten von Untereinheiten, b) Abstoßung von gleichgeladenen Liganden, c) Bildung von unterschiedlichen Bindungsstellen durch geometrische Anordnung von identischen Untereinheiten, d) ligandeninduzierte Konformationsänderungen, als auslösendes Moment der Wechselbeziehung von Untereinheiten.

LEVITZKI und KOSHLAND (1969) wiesen außerdem nach, daß negative Kooperativität nur auf dem "sequentiellen Modell" für die Wechselwirkung von Untereinheiten basieren kann ("sequentielles Modell" = "induced fit" oder Abhängigkeit von Art und Stärke der Wechselwirkung der Untereinheiten).

In Abb. 42 sind noch einmal eine Standard-Sättigungskurve (A), eine doppelt-reziproke (B) und eine Hill-Auftragung (C) aufgeführt, für positive und negative Kooperativität sowie für klassische Michaelis-Menten-Kinetiken.

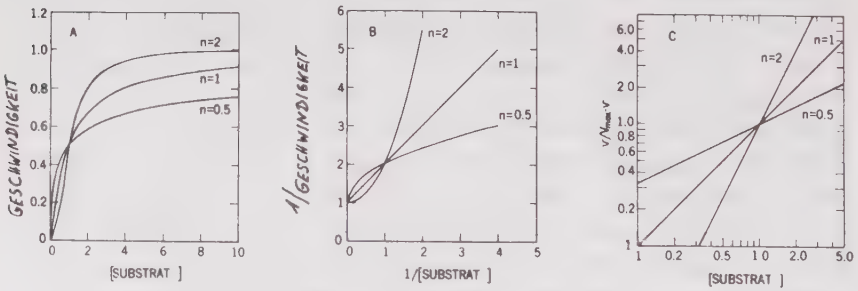


Abb. 42: Es handelt sich um theoretische Kurven für V_m = 1, K = 1, n = 0,5, 1 und 2

A — MICHAELIS-MENTEN-Auftr.

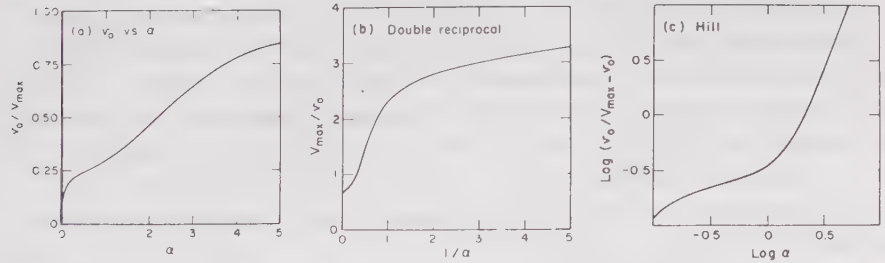
B — LINEWEAVER-BURK-Auftr.

C — HILL-Auftr.

	(A)	(B)	(C)
Positive Kooperativität:	sigmoide Kurve RS < 81	konkav aufwärtsführender Kurvenverlauf	Hill-Koeffizient > 1 (Beispiel: n = 2)
Keine Kooperativität:	normale Michaelis-Menten-Kinetik RS = 81	linearer Kurvenverlauf	Hill-Koeffizient = 1
Negative Kooperativität:	gleich der Michaelis-Menten-Kinetik RS > 81	konkav abwärtsführender Kurvenverlauf	Hill-Koeffizient < 1 (Beispiel: n = 0,5)

Zum Vergleich sind in Abb. 43 die drei verschiedenen Auftragungen für ein Enzym wiedergegeben, das in seiner Substratsättigungskurve eine Zwischen-Plateau-Region aufweist (aus Arbeit von TEIPEL und KOSHLAND, 1969).

Abb. 43



Daraus wird deutlich, daß in jeder Auftragung die charakteristische Plateau-Region zum Ausdruck kommt. Im Fall der Hill-Auftragung konnte jedoch eine ähnliche Kurve für ein Enzym mit progressiv abnehmender Affinität zum Substrat erhalten werden. Die Stärke der Plateaus und Maxima war nach TEIPEL und KOSHLAND (1969) abhängig von der Wahl und dem Verhältnis der wahren kinetischen Konstanten und der wahren Bindungskonstanten der verschiedenen Gleichgewichte. Bei steigender Zahl an Substratbindungsstellen wurde der Wechsel von einer Plateau-Region zur sigmoidalen Region ausgeprägter.

Das Phänomen einer Zwischen-Plateau-Region war schon bei der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (CORWINN und FANNING, 1968), der β-ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (GENTER und PREISS, 1968) und der Cytidin-Triphosphat-Synthetase (LEVITZKI und KOSHLAND, 1969) von *E. coli*, bei der Glutamat-Dehydrogenase (LE JOHN und JACKSON, 1968) von *Blastocladiella* und der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GELB und NORDIN, 1969) von Insekten festgestellt worden.

TEIPEL und KOSHLAND (1969) wiesen nach, daß nur Enzyme, die mehr als zwei Substratbindungsstellen besitzen, eine Zwischen-Plateau-Region innerhalb einer Substratsättigungskurve zeigen können, und zwar nur dann, wenn die relative Größe der katalytischen oder Bindungskonstanten zuerst abnahm und dann zunahm, wenn das Enzym gesättigt vorlag. Es war nicht der Fall, wenn die relative Größe fortschreitend zunahm, abnahm oder konstant war.

Eine zunehmende Affinität zum Liganden wird positiven kooperativen Effekten allosterischer Typen zugeschrieben. Eine abnehmende Affinität kann für eine einzige Proteinart durch ligandeninduzierte Konformationsänderung hervorgerufen werden und als negativer kooperativer Effekt bezeichnet werden. Bei Vermischen von zwei oder mehreren Proteinen oder Untereinheiten, jeder mit einer unterschiedlichen wirklichen Bindungskonstanten, kann eine abnehmende Affinität hervorgerufen worden sein. Fälle, bei denen zuerst ein Absinken der Affinität zum Liganden vorliegt, gefolgt von einer zunehmenden Affinität, können auf zweierlei Weise erklärt werden:

1. Wenn nur ein Protein für das beobachtete Phänomen verantwortlich ist, kann der kurvige Verlauf durch Liganden-induzierte kooperative Wechselwirkungen erzeugt werden, wobei die negativen kooperativen Effekte bei niedrigen Substratkonzentrationen überwiegen, bei höheren Substratkonzentrationen die positiven kooperativen Wechselwirkungen.
2. Die auftretende flukturierende Affinität zu dem Liganden kommt durch das Zusammenspiel von zwei verschiedenen Proteinen zustande, wobei das eine Protein MICHAELIS-MENTEN- oder

negatives Verhalten zeigt und das andere positives kooperatives Verhalten. Dabei ist jedoch notwendig, daß die Größe der wahren Bindungskonstanten des MICHAELIS-MENTEN- oder negativ kooperativen Enzyms größer ist als die erste wahre Bindungskonstante des positiv kooperativen Enzyms.

Für die Citrat-Lyase aus *S. diacetilactis* und für die anderer Milchsäurebakterien (KÜMMEL, 1973) waren nicht nur eine, sondern mehrere Zwischen-Plateau-Regionen erhalten worden. Da aufgrund des Aufbaus der Citrat-Lyase mehrere Substratbindungsstellen angenommen werden konnten, war die Voraussetzung für das Erscheinen von Zwischen-Plateau-Regionen gegeben. Durch die Wechselwirkung negativer und positiver Effekte könnten die "bumpy curves" demnach erklärt werden, wodurch die Affinität der Bindung abnähme, während die katalytische Reaktivität für die Bindungsstelle zunehmen würde. Aus der Hill-Auftragung war die Existenz von mindestens drei Bindungsstellen für Citrat abgelesen worden und sowohl in dieser als auch in der Lineweaver-Burk-Auftragung die Wechselwirkung positiver und negativer Kooperativität zum Ausdruck gekommen. Hill-Koeffizienten < 1, $= 1$ und > 1 wurden erhalten. Die aufgetretenen "bumps" konnten als Ausdruck für die Anzahl mehrerer Substratbindungsstellen infrage kommen. Drei ausgeprägte "bumps" waren erkennbar, weitere waren angedeutet. Sechs Substratbindungsstellen waren nach Kenntnis der Struktur der Citrat-Lyase zu fordern.

Eine weiterführende Interpretation der erhaltenen Substratsättigungskurve war möglich, da positive und negative Kooperativität nicht nur durch Konformationsumwandlungen mit einer Änderung der Affinität der Substrat-bindenden Zentren erklärt werden kann, sondern auch durch andere Modelle, in denen ein "zeitabhängiger Schritt" apparente Kooperativität hervorruft (AINSLE et al., 1972).

FRIEDEN (1970) definierte "Hysteretische Enzyme" als solche, die langsam auf einen schnellen Ligandenwechsel reagieren. Der langsame Reaktionsschritt konnte auf einer Isomerisierung, einer

Dissoziation-Assoziation oder auf Bindung eines anderen Liganden beruhen. Er diskutierte die Möglichkeit, daß "hysteretische Enzyme" als "zeitabhängige Puffer" fungieren, die durch ihre langsame Reaktion auf Änderung des Ligandenlevels eventuell eine Beeinflussung der kinetischen Charakteristiken bewirken.
Diese "hysteretische" Antwort war durchaus vereinbar mit den Modellen von KOSHLAND et al. (1966) und MONOD et al. (1965).

AINSLE et al. (1972) zeigten bei der Analyse der "steady state" Kinetiken des "slow isomerization mechanism", daß sowohl positive als auch negative Kooperativität auftreten konnte, die sich in "bursts" oder "lags" der Enzymaktivität äußerte. Die Kooperativität dieser Systeme war abhängig von Veränderungen einzelner Geschwindigkeitskonstanten. Die notwendige Bedingung für dieses Modell war, daß sich der Bindungs- und Isomerisierungsschritt des Mechanismus im "steady state" und nicht im Gleichgewicht befand. FRIEDEN (1970) hatte als Argument die Annahme des "rapid equlibrium" im Isomerisierungsmechanismus gegen die Möglichkeit einer Kooperativität gebraucht.

Nach AINSLE et al. (1972) konnten Liganden das Ausmaß und die Art der Kooperativität verändern, die, wie gesagt, abhängig war von bestimmten Geschwindigkeitskonstanten. Würden die Reaktionen, wie Isomerisierung oder Ligandenbindung sehr schnell erfolgen, dann wäre der Beitrag dieser Konformationsänderung zur Gesamtkooperativität vernachlässigbar gering.
Bei einer wesentlich vorteilhafteren Auslegung des "slow isomerization mechanism" wäre anzunehmen, daß er einen unabhängigen Beitrag zur Wechselwirkung von Untereinheiten und zum gesamten kinetischen Verhalten zusteuert.
Besteht zum Beispiel eine positive Kooperativität zwischen Untereinheiten, und der Isomerisierungsbeitrag ist ebenfalls positiv, dann werden die Auswirkungen der positiven Kooperativität noch verstärkt. Entsprechend ist es im umgekehrten Fall für negative Kooperativität. Wenn jedoch die einzelnen Faktoren in ihrem Beitrag zur Kooperativität entgegenwirkend sind, d. h.

positive Wechselwirkung der Untereinheiten und negative Wechselwirkung bei Isomerisierung oder umgekehrt, dann können sich die Substratsättigungskurven der MICHAELIS-MENTEN-Auftragung nähern oder zeigen Minima und Maxima, ähnlich der "bumpy curves", hervorgerufen durch Substrat-induzierte Konformationsänderung bei Veränderung der Bindungskonstanten (TEIPEL und KOSHLAND, 1969). Bei diesen Versuchen bestand bemerkenswerterweise ebenfalls ein "steady state" und kein Gleichgewicht.

Um eine Aussage machen zu können, ob es sich bei den "bumpy curves" in der Substratsättigungskurve von *S. diacetilactis* um eine Wechselwirkung von positiver und negativer Kooperativität durch Änderung der Bindungskonstanten handelt oder um die Auswirkungen eines "zeitabhängigen" Isomerisierungsschrittes, müßten weitere Bindungsanalysen und Berechnungen durchgeführt werden. Es kann nicht entschieden werden, ob die Ergebnisse einem Modell oder der Überlagerung durch mehrere Modelle entsprechen.

Die folgende Hypothese kann nur unter dem Gesichtspunkt gestellt werden, daß eine durch Affinitätsänderung des Substrates bedingte Konformationsänderung des Enzymproteins sichtbar werden kann:
Ring- und Sternform der Citrat-Lyase stehen im Gleichgewicht. Beide Formen sind katalytisch aktiv, sie unterscheiden sich durch ihre Affinität zum Substrat. Bei der Sternform ist die Affinität durch negative Kooperativität verringert, was sich in verminderter Enzymaktivität äußert. Die kleinen Untereinheiten sind aus der Ringkonfiguration nach innen gewandert unter Bildung des Sterns. Die Sternform tritt nur bei bestimmten Substratkonzentrationen auf.
Diese Schlußfolgerungen wurden gezogen, nachdem bei Vergleich der Substratsättigungskurve mit den Werten für eine erhöhte Sternbildung auffiel, daß eine vermehrte Sternbildung nur bei den Minima der Kurve auftrat. Die deutlichste Erhöhung lag für die Citrat- und Tricarballylatkonzentration bei 1 mM, d. h.

im Minimum, welches auf das ausgeprägteste Maximum (bump) in der Substratsättigungskurve folgte. Eine vollständige Umwandlung von Ringen in Sterne wurde nie beobachtet.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Wachstumsrate und die Ausbeute von *Streptococcus diacetilactis* wurden mit zunehmender Citratkonzentration im Nährmedium stimuliert.

2. In zellfreien Extrakten von *S. diacetilactis* war die aktive Citrat-Lyase mit einer spezifischen Aktivität von 7 E/mg Protein vorhanden. Das Enzym erwies sich am stabilsten in Kaliumphosphatpuffer. Entgegen den Untersuchungen von HARVEY und COLLINS (1961) wurde gefunden, daß die Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* nicht konstitutiv gebildet wurde. In Abwesenheit von Citrat war nur ein Grundlevel an Enzym vorhanden, der etwa 1/10 der Aktivität von Citrat-Zellen entsprach.

3. Die Citrat-Lyase wurde durch Al $(OH)_3$ C_r-Fällung, Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie 38fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 125 E/mg angereichert. Die Ausbeute betrug 12%. Die Homogenität des erhaltenen Enzympräparates wurde mit Hilfe der Polyacrylamid-Diskelektrophorese und der analytischen Ultrazentrifugation belegt. Bei Alterung des Proteins traten infolge der Dissoziation des Enzymkomplexes zwei unterschiedlich starke Banden in der Elektrophorese auf.

4. Ein Gesamtmolekulargewicht des Multienzymkomplexes von 540.500 ergab sich bei Anwendung der analytischen Ultrazentrifuge. Die Molekulargewichte der Untereinheiten wurden mit Hilfe der SDS-Elektrophorese bestimmt. Nach Inkubation mit 1% SDS oder 8 M Harnstoff in Gegenwart eines Reduktionsmittels dissoziierte das Enzymprotein in drei nicht identische Untereinheiten. Bei Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit der drei Banden mit den Polypeptidketten von Referenzproteinen konnte im Durchschnitt ein Molekulargewicht von 53.500, 36.300 und 11.400 ermittelt werden.

5. Im Gegensatz zu den Lyasen von *R. gelatinosa* und *K. aerogenes* unterlagen die Enzyme von *S. diacetilactis* und *L. citrovorum* nur einer sehr schwachen Reaktionsinaktivierung. Die Zugabe von Oxalacetat und die Variation der Mg^{++}-Ionen-Konzentration und des pH-Wertes hatten keinen Einfluß. Bei Zugabe von DTE, Harnstoff, Jodacetat, ATP oder ADP konnte eine Verstärkung der Inaktivierung gemessen werden.

6. Der K_m-Wert für Citrat konnte nicht bestimmt werden, da die Substratsättigungskurve einen hyperbolischen Verlauf bei niedrigen und einen mehrfachen Wechsel von hyperbolischen und sigmoiden Bereichen bei höheren Substratkonzentrationen zeigte ("bumpy curves").

7. Zur Herstellung von SH-Citrat-Lyase wurde ein Inaktivierungstest ausgearbeitet. Inkubation des Enzyms mit 4 mM Dithiothreitol bei pH 7,8 und bei 30^{o} C führte innerhalb einer Stunde zur vollständigen Desacetylierung. Zur Aufbewahrung des SH-Enzyms mußte der pH auf 6,2 eingestellt werden.

8. Im hochgereinigten Enzympräparat der Citrat-Lyase konnte ein acetylierendes Enzym, die Acetat: HS-Citrat-Lyase-Ligase, nachgewiesen werden, welche inaktive HS-Citrat-Lyase mit ATP und Acetat in die enzymatisch aktive Acetyl-S-Citrat-Lyase überführte. Diese Enzymaktivität wurde 26fach angereichert und schien mit der Citrat-Lyase assoziiert zu sein. Ihre Substrate, Acetat und ATP konnten durch Acetyladenylat ersetzt werden.

9. Die Acetylierungsaktivität war von der Konzentration an Mg^{++}-Ionen, der Temperatur, der DTE-Konzentration und dem Alter der Citrat-Lyase abhängig. Maximale Acetylierungsgeschwindigkeiten ergaben sich in einem Bereich von 2-10 mM Mg^{2+} im Inkubationsansatz sowie einer DTE-Konzentration von 2-6 mM und bei einer Temperatur von $25-27^{o}$ C. Unter optimalen Bedingungen lagen 3 Einheiten desacetylierte Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* nach 25 min aktiviert vor. Das acetylieren-

de Enzym war spezifisch für die Citrat-Lyase von *S. diacetilactis*. Es war nicht in der Lage, die HS-Lyasen von *R. gelatinosa* und *K. aerogenes* zu acetylieren. Es war möglich, die Citrat-Lyase wiederholt zu inaktivieren und reaktivieren.

10. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Quartärstruktur der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* waren drei Formen erkennbar: "Ringe", "Sterne" und "Dreiecke", die im Verhältnis von ∼86% zu 7-11% zu 0,5-3% zueinander standen. Die Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte keine morphologischen Unterschiede zwischen den Ringen der Citrat-Lyase von *S. diacetilactis* und den Ringen von *R. gelatinosa*. Die genaue Bestimmung der Strukturen erfolgte mit Hilfe der "Markham-Rotation".

11. Es wurde versucht, die Funktion und die Beziehung der drei Formen zueinander nachzuweisen. Das Verhältnis von Ring- und Sternform veränderte sich nicht im Alterungsprozeß. Es bestand kein Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Enzym, d. h. zwischen acetyliertem, reduziertem und oxydiertem Protein.

Die Enzymmoleküle der CL waren in der Lage, nach Dissoziation in Untereinheiten mit 6 M Harnstoff wieder zu reaggregieren. Die Proteinmoleküle waren nicht nur visuell intakt, sondern auch wieder enzymatisch aktiv. 50% der Aktivität konnten nach vorheriger Behandlung mit DTE und nachfolgender chemischer Acetylierung zurückerhalten werden. Das Acyl-Carrier-Protein wurde demnach durch Harnstoffinkubation teilweise desacetyliert und oxydiert. Die Acetat:SH Enzym-Ligase war ebenfalls im reaggregierten Enzym noch teilweise aktiv, was eine Reaktivierung nach Inkubation mit DTE und ATP und Acetat bewies.

Zwei Konfigurationsformen erschienen unter allen Bedingungen nach der Reaggregation im elektronenmikroskopischen Bild im

gleichen Verhältnis wie üblich wieder: der Ring und der Stern. Die Dreieckstruktur fehlte. Bei Versuchen zur Trennung der drei Formen durch Ionenaustauschchromatographie konnte die Dreieckform isoliert werden. Sie zeigte keinerlei CL-Aktivität; in der SDS-Elektrophorese trat nur eine Bande vom MG 53.500 auf, die der großen Untereinheit der Citrat-Lyase entsprach.

Da das Verhältnis von Ring- und Sternform unter allen Bedingungen gleich geblieben war, konnte angenommen werden, daß beide Formen im Gleichgewicht miteinander standen. In der Vermutung, daß die durch Substratumsatz erfolgende Reaktion sich in einer Konfigurationsänderung äußern könnte und somit eine Veränderung des Verhältnisses erzielt werden könnte, wurde mit dem Substrat Citrat und den Substratanalogen Tricarballylat, Fluorcitrat und Isocitrat inkubiert. Eine eindeutige Erhöhung der Sternanzahl um den Faktor 4,5 konnte nur nach Inkubation der Citrat-Lyase bei einer Citratkonzentration von 1 mM nachgewiesen werden. Fluorcitrat und Isocitrat waren wirkungslos, während Tricarballylat die Aktivität der Citrat-Lyase hemmte und das Verhältnis von Ring- und Sternform beeinflußte; jedoch konnte kein wesentlich höherer Prozentsatz an Sternen als nach Citratinkubation erzielt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

AINSLIE, G.R. SHILL, J.P. NEET, K.E.	1972	Transients and Cooperativity J. Biol. Chem. 247, 7088-7096
ATKINSON, D.E. HATHAWAY, J.A. SMITH, E.C.	1965	Kinetics of Regulatory Enzymes J. Biol. Chem. 240, 2682-2690
ATKINSON, D.E.	1966	Regulation of enzyme activity Ann. Rev. Biochem. 35, 85-124
BERG, P.	1956	Zit. n. SCHMELLENKAMP (Diss., 1974) J. Biol. Chem. 222, 991-1013
BERG, P.	1962	In: Methods in Enzymology, eds. COLOWICK, S.P. und KAPLAN, N.O., Academic Press, New York, 5, 466
BERGMEYER, H.U.	1970	Bestimmung der Acetat-Kinase in: Methoden der enzym. Analyse, ed. BERGMEYER, H.U. (Verlag Chemie, Weinheim), 1, 389
BERGMEYER, H.U.	1970	Bestimmung der Adenylat-Kinase in: Methoden der enzym. Analyse, ed. BERGMEYER, H.U. (Verlag Chemie, Weinheim), 1, 447
BERGMEYER, H.U.	1970	Bestimmung der Phosphotrans-acetylase in: Methoden der enzym. Analyse, ed. BERGMEYER, H.U. (Verlag Chemie, Weinheim), 1, 468
BERGMEYER, H.U.	1970	Bestimmung der Citrat-Synthase in: Methoden der enzym. Analyse, ed. BERGMEYER, H.U. (Verlag Chemie, Weinheim), 1, 404
BEUSCHER, N.	1974	Citrat-Lyase von *Rhodopseudomonas gelatinosa*. Anreicherung, Charakterisierung und Aufbau des Enzyms Diss. Göttingen

BEUSCHER, N.
MAYER, F.
GOTTSCHALK, G.
1974 Citrate Lyase from *Rhodopseudomonas gelatinosa:* Purification, electron microscopy and subunit structure
Arch. Mikrobiol. 100, 307-328

VAN BEYNUM, J.
PETTE, J.W.
1939 The decomposition of citric acid by *Betacoccus cremoris*
J. Dairy Res. 10, 250-266

BLAIR, J. McD.
DATTA, S.P.
TATE, S.S.
1967 Reversible Inactivation of Citrate Lyase: Effect of Metal Ions and Adenine Nucleotides
Eur. J. Biochem. 1, 26-28

BOHR, C.
1903 Zit. n. TEIPEL, J. und KOSHLAND, D.E. (1969)
Z. Physiol. 17, 682

BOWEN, T.G.
ROGERS, L.J.
1963 The product inhibition of citrate-oxalacetat-lyase from *A. aerogenes*
Biochem. Biophys. Acta 77, 685-687

BOWEN, T.G.
MORTIMER, M.G.
1971 Sub-Units of Citrate-Oxalacetate-Lyase
Eur. J. Biochem. 23, 262-266

BRANEN, A.L.
KEEMAN, T.W.
1971 Effects of Citrate on the Composition and Metabolism of *Lactobacillus casei*
Am. Soc. Microbiol. 21, 993-998

BREWER, C.R.
WERKMAN, C.H.
1939 The anaerobic dissimilation of citric acid by *Aerobacter indologenes*
Enzymologia 6, 273-281

BUCKEL, W.
BUSCHMEIER, V.
EGGERER, H.
1971 Der Wirkungsmechanismus der Citrat-Lyase aus *Klebsiella aerogenes*
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1195-1205

BUCKEL, W.
EGGERER, H.
1972 Acetyl-phosphopantethein und Acetyl-CoA als Wirkungsgruppen der Citrat-Lyase
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1506

BUCKEL, W.
ZIEGERT, K.
EGGERER, H.
1973 Acetyl-CoA-Dependent Cleavage of Citrate on Inactivated Citrate Lyase
Eur. J. Biochem. 37, 295-304

BUCKEL, W.
1975 Der Multienzymkomplex Citramalat-Lyase
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 223-224

CAMPBELL, J.J.R.
GUNSALUS, I.C.
1944 Citric acid fermentation by Streptococci and Lactobacilli
J. Bacteriol. 48, 71-76

CERIOTTI, G.
1952 A microchemical determination of deoxyribonucleic acid
J. Biol. Chem. 198, 297-303

CHANGEUX, J.P.
1963 Allosteric interactions on biosynthetic L-threonine desaminase from *E. coli K12*
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 497-504

CLARKE, H.B.
CUSWORTH, D.C.
DATTA, S.P.
1954 Biochem. J. 58, 146

CONWAY, A.
KOSHLAND, D.E. jr.
1968 Negative Cooperativity in Enzyme Action. The Binding of Diphospho-pyridine Nucleotide to Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
Biochem. 7, 4011-4022

CORI, G.T.
GREEN, A.A.
1943 Zit. n. MECKE (1966)
J. Biol. Chem. 151, 31

CORWIN, L.M.
FANNING, G.K.
1968 Studies of parameters effecting the allosteric nature of phosphoenol-pyruvate carboxylase of *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. 243, 3517-3525

DAGLEY, S.
DAWES, E.A.
1953a Citric acid metabolism of *Aerobacter aerogenes*
J. Bacteriol. 66, 259-265

DAGLEY, S.
DAWES, E.A. 1953b Dissimilation of citric acid by bacterial extracts
Nature 172, 345-346

DAGLEY, S.
DAWES, E.A. 1955 Citridesmolase: its properties and mode of action
Biochem. Biophys. Acta 17, 177-184

DAGLEY, S. 1969 In: Methods in Enzymology, ed. LOWENSTEIN, J.M., Academic Press, New York, 13, 160

DAVIS, B.J. 1964 Zit. n. MAURER, H. R. (1968), Disk-Elektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404

DEFFNER, M.
FRANKE, W. 1939 Der Abbau der Citronensäure durch Bakterien
Ann. Chem., Justus Liebigs 541, 85-117

DIMROTH, P.
GREULL, G.
SEYFFERT, R.
LYNEN, F. 1972 Zit. n. DIMROTH (1975)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 126

DIMROTH, P.
DITTMAR, W.
WALTHER, G.
EGGERER, H. 1973 The Acyl-Carrier Protein of Citrate Lyase
Eur. J. Biochem. 37, 305-315

DIMROTH, P.
EGGERER, H. 1975a Isolation of Subunits of Citrate Lyase and Characterization of their Function in the Complex
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3458-3462

DIMROTH, P. 1975b Composition of the Citrate Lyase Acyl-Carrier Protein from *Klebsiella aerogenes*
FEBS Lett. 51, 100-104

DIMROTH, P.
MAYER, K.
EGGERER, H.
1975c On the mechanism of action of Isocitrate Lyase
Eur. J. Biochem. 51, 267-273

DIMROTH, P.
EGGERER, H.
1975d Evaluation of the protein components of Citrate Lyase from *Klebsiella aerogenes*
Eur. J. Biochem. 53, 227-235

ELLMANN, G.L.
1959 Tissue Sulfhydryl Groups
Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77

FISH, W.W.
REYNOLDS, J.A.
TANFORD, Ch.
1970 Gel Chromatography of Proteins in Denaturing Solvents
J. Biol. Chem. 245, 5166-5168

FRIEDEN, C.
1970 Kinetic Aspects of Regulation of Metabolic Processes
J. Biol. Chem. 245, 5788-5799

GELB, W.
NORDIN, G.H.
1969 Kinetics of anomalous binding of substrate and cofactor to insects. Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Fed. Proc. 28, 853

GENTNER, N.
PREISS, J.
1968 Biosynthesis of bacterial glycogen
J. Biol. Chem. 243, 5882-5891

GEVERS, W.
KLEINKAUF, H.
LIPMANN, F.
1968 The Activation of Amino Acids for Biosynthesis of Gramicidin S
Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 269-276

GEVERS, W.
KLEINKAUF, H.
LIPMANN, F.
1969 Peptidyl Transfers in Gramicidin S Biosynthesis from Enzyme-bound Thioester Intermediates
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 1335-1342

GIFFHORN, F.
BEUSCHER, N.
GOTTSCHALK, G.
1972 Regulation of Citrate Lyase Acticity in *Rhodopseudomonas gelatinosa*
Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 467-472

GIFFHORN, F.
GOTTSCHALK, G. 1975a Effect of Growth Conditions on the Activation and Inactivation of Citrate Lyase of *Rhodopseudomonas gelatinosa*
J. Bacteriol. 124, 1046-1051

GIFFHORN, F.
GOTTSCHALK, G. 1975b Inactivation of Citrate Lyase from *Rhodopseudomonas gelatinosa* by a Specific Deacetylase and Inhibition of this Inactivation by L-(+)-Glutamate
J. Bacteriol. 124, 1052-1061

GILLESPIE, D.C.
GUNSALUS, I.C. 1953 An adaptive citric acid desmolase in *Streptococcus faecalis*
Bacteriol. Proc., 73

GINSBURG, A.
STADTMAN, E.R. 1970 Multienzyme Systems
Ann. Rev. Biochem. 39, 429-472

GOLDMAN, P.
ALBERTS, A.W.
VAGELOS, P.R. 1963 The Condensation Reaction of Fatty Acid Biosynthesis
J. Biol. Chem. 238, 1255-1261

GOTTSCHALK, G.
GIFFHORN, F.
BEUSCHER, N. 1974 Enzyme-catalyzed modification of citrate lyase during growth of *Rhodopseudomonas gelatinosa* on citrate
Bact. Proc. 21

GRUNBERG-MANAGO, H.
GUNSALUS, I.C. 1953 Aerobic and anaerobic citric acid metabolism of *E. coli*
Bacteriol. Proc. 73

HARTREE, E.F. 1972 Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response
Analyt. Biochem. 48, 422-427

HARVEY, R.J.
COLLINS, E.B. 1961 Role of citritase in acetoin formation by *S. diacetilactis* and *L. citrovorum*
J. Bacteriol. 82, 954-959

HARVEY, R.J.
COLLINS, E.B. 1962 Citrate Transport System of *Streptococcus diacetilactis*
J. Bacteriol. 83, 1005-1009

HARVEY, R.J.
COLLINS, E.B. 1963 The citritase of *Streptococcus diacetilactis*
J. Biol. Chem. 238, 2648-2653

VAN HOLDE, K.E.
BALDWIN, R.L. 1958 Rapid attainment of sedimentation equilibrium
J. Physic. Chem. 62, 734-743

VAN HOLDE, K.E. 1967 Beckman Instruments Inc. Palo Alto Fractions No. 1

HORNE, R.W.
GREVILLE, G.D. 1963 Observations on Ox-Liver L-Glutamate Dehydrogenase with the Electron Microscope
J. Mol. Biol. 6, 506-509

JENCKS, W.P. 1963 In: Methods in Enzymology, eds. COLOWICKS, S.P. and KAPLAN, N.O., Academic Press, New York, 6, 762

LE JOHN, H.B.
JACKSON, A. 1968 Allosteric Interactions of a Regulatory Nicotinamide Adenine Dinucleotide Specific Glutamate Dehydrogenase from *Blastocladiella*
J. Biol. Chem. 243, 3447-3457

KLEINKAUF, H.
GEVERS, W.
LIPMANN, F. 1969 Interrelation between Activation and Polymerization in Gramicidin S Biosynthesis
Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 226-231

KLEINKAUF, H.
GEVERS, W.
ROSKOSKI, R. jr.
LIPMANN, F. 1970 Enzyme-bound Phosphopantetheine in Tyrocidine Biosynthesis
Biochem. Biophys. Res. Comm. 41, 1218-1230

KLEINKAUF, H.
ROSKOSKI, R. jr.
LIPMANN, F.
1971 Pantetheine-Linked Peptide Intermediates in Gramicidin S and Tyrocidine Biosynthesis
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2069-2072

KOENIG, R.
STEGEMANN, H.
FRANCKSEN, H.
PAUL, H.L.
1970 Protein subunits in the Potato virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 207, 184-189

KOHLRAUSCH, F.
1897 Zit. n. MAURER, H.R. (1968)
Ann. Phys. Chem. 62, 209

KOSHLAND, D.E. jr.
NEMÉTHY, G.
FILMER, D.
1966 Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits
Biochem. 5, 365-385

KREBS, H.A.
JOHNSON, H.A.
1937 Zit. n. SRERE, P.A. (1968)
Enzymologia 4, 148

KÜMMEL, A.
1973 Anreicherung und Eigenschaften der Citrat-Lyase von Milchsäurebakterien
Diplomarbeit Göttingen

KÜMMEL, A.
BEHRENS, G.
GOTTSCHALK, G.
1975 Citrate Lyase from *Streptococcus diacetilactis* Association with Its Acetylating Enzyme
Arch. Microbiol. 102, 111-116

KULLA, H.
1973 Die physiologische Bedeutung der chemischen Modofizierbarkeit der Citrat-Lyase von *Klebsiella aerogenes*
Diplomarbeit, Göttingen

LANE, M.D.
MOSS, G.
POLAKIS, S.E.
1974 In: Current Topics in Cellular Regulation, eds. HORECKER, B.L. und STADTMAN, E.R., Academic Press, New York, 8, 139-187

LEE, S.
ROSKOSKI, R. jr.
BAUER, K.
LIPMANN, F.
1973 Purification of the Polyenzymes Responsible for Tyrocidine Synthesis and their Dissociation into Subunits
Biochem. 12, 398-403

LEVITZKI, A. KOSHLAND, D. E. jr.	1969	Negative Cooperativity in Regulatory Enzymes Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 1121-1128
LIPMANN, F.	1973	Zit. n. DIMROTH, P. und EGGERER, H. (1975) Acc. Chem. Res. 6, 361-367
LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, H.J. FARR, A.L. RANDALL, R.J.	1951	Protein measurement with the folin-phenol reagent J. Biol. Chem. 193, 265-275
LYNEN, F.	1961	Fed. Proc. 20, 941
LYNEN, F. HOPPER-KESSEL, J. EGGERER, H.	1964	Biochem. Z. 340, 95
LYNEN, F. OESTERHELT, D. SCHWEIZER, E. WILLECKE, K.	1968	Cellular Compartimentalization and Control of Fatty Acid Metabolism, 1 (GRAN, F.C., ed., Academic Press, New York)
LYNEN, F.	1967	The role of Biotin-Dependent Carboxylations in Biosynthetic Reactions Biochem. J. 102, 381-400
MAHADIK, S.P. SIVA RAMAN, C.	1968	Citrate Lyase: Molecular Weight and Subunit Structure Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 167-171
MAHLER, H.R.	1961	Ann. N. Y. Acad. Sci. 92, 426
MARKHAM, R. FREY, S. HILLS, G.J.	1963	Methods for the Enhancement of Image Detail and Accentuation of Structure in Electron Microscopy Virology 20, 88-102
MARTIN, D.B. VAGELOS, P.R.	1962	The Mechanism of Tricarboxylic Acid Cycle Regulation of Fatty Acid Synthesis J. Biol. Chem. 237, 1787-1792

MECKE, D.
WULFF, F.
LIESS, K.
HOLZER, H.
1966 Characterization of a Glutamine Synthetase Inactivating Enzyme from *Escherichia coli*
Biochem. Biophsy. Res. Comm. 24, 452-458

MICHAELIS, L.
MENTEN, M.
1913 Biochem. Z. 49, 333

MIZUNO, W.G.
JEZESKI, J.J.
1959 Studies on starter metabolism IV. Effect of various substrates on the formation of acetoin by a mixed strain starter culture
J. Dairy Sci. 42, 251-263

MOELLERING, H.
GRUBER, W.
1966 Determinations of Citrate with Citrate Lyase
Anal. Biochem. 17, 369-376

MONOD, J.
WYMAN, J.
CHANGEUX, J.P.
1965 On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model
J. Mol. Biol. 12, 88-118

ORNSTEIN, L.
1964 Zit. n. MAURER, H.R. (1968)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321

PARMEGGIANI, A.
BOWMAN, R.H.
1963 Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 268

PEACOCK, A.C.
DINGMAN, C.W.
1968 Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels
Biochem. 7, 668-674

PRESCOTT, D.J.
VAGELOS, P.R.
1972 Acyl-Carrier-Protein
Adv. Enzymol. 36, 269-311

RIORDAN, J.F.
VALLEE, B.L.
1972 In: Methods in Enzymology, eds. HIRS, C.H.W. and TIMASHEFF, S.N.
25, 494-499

ROBINSON, J.B. jr.
SINGH, M.
SRERE, P.A.
1976 Structure of the prosthetic group of *Klebsiella aerogenes* citrate (pro-3S)-lyase
Nat. Acad. Sci. 73, 1872-1876

ROSKOSKI, R. jr.
KLEINKAUF, H.
GEVERS, W.
LIPMANN, F.
1970 Tyrocidine Biosynthesis by Three Complementary Fractions from *Bacillus brevis* (ATCC 8185) Biochem. 9, 4839-4845

ROSKOSKI, R. jr.
RYAN, G.
KLEINKAUF, H.
GEVERS, W.
LIPMANN, F.
1971 Polypeptide Biosynthesis from Thioesters of Amino Acids Arch. Biochem. Biophys. 143, 485-492

SCHMELLENKAMP, H.
1974 Acetat: SH (ACP) Enzym-Ligase aus *Klebsiella aerogenes* Diss. Regensburg

SCHMELLENKAMP, H.
EGGERER, H.
1974 Mechanism of Enzymic Acetylation of des-Acetyl Citrate Lyase Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1987-1991

SHAPIRO, A.L.
VINUELA, E.
MAIZEL, J.V. jr.
1967 Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820

SIMON, E.J.
SHEMIN, D.
1953 The preparation of S-Succinyl-CoA J. Amer. Chem. Soc. 75, 2520

SINGH, M.
SRERE, P.A.
1971 The Reactioninactivation of Citrate Lyase from *Aerobacter aerogenes* J. Biol. Chem. 246, 3847-3850

SINGH, M.
BÖTTGER, B.
STEWART, C.
BROOKS, G.G.
SRERE, P.A.
1973 S-Acetyl Phosphopantetheine: Deacetyl Citrate Lyase S-Acetyl Transferase from *Klebsiella aerogenes* Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 1-9

SINGH, M.
CARPENTER, D.E.
SRERE, P.A.
1974 Nonidentical Subunits of Citrate Lyase from *Klebsiella aerogenes* Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 1211-1218

SINGH, M.
STEWART, C.
SRERE, P.A.
1974 Citrate Lyase from *Streptococcus diacetilactis*: an acetyl enzyme containing pantothenic acid Fed. Proc. 33, 1380

SINGH, M.
SRERE, P.A. 1975 Purification and Properties of Citrate Lyase from *Streptococcus diacetilactis*
J. Biol. Chem. 250, 5818-5825

SINGH, M.
SRERE, P.A.
KLAPPER, P.G.
CAPRA, J.D. 1976 Subunit and Chemical Composition of Citrate Lyase from *Klebsiella aerogenes*
J. Biol. Chem. 251, 2911-2915

SMITH, R.A.
STAMER, J.R.
GUNSALUS, I.C. 1956 Biochem. Biophys. Acta 19, 567

SRERE, P.A. 1968 In: T.W. GOODWIN, The metabolic roles of citrate
Academic Press, London and New York

SRERE, P.A.
BÖTTGER, B.
BROOKS, G.G. 1972 Citrate Lyase: A Pantothenate-Containing Enzyme
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 1201-1202

STEGEMANN, H. 1972 Apparatur zur thermokonstanten Elektrophorese oder Fokussierung und ihre Zusatzteile
Z. Anal. Chem. 261, 388-391

SWANK, R.T.
MUNKRES, K.D. 1971 Molecular Weight Analysis of Oligopeptides by Electrophoresis in Polyacrylamide Gel with Sodium Dodecyl Sulfate
Anal. Biochem. 39, 462-477

TATE, S.S. 1963 Ph. D. Thesis
University of London

TATE, S.S.
DATTA, S.P. 1964 Biochem. J. 91, 18c

TEIPEL, J.
KOSHLAND, D.E. 1969 The Significance of Intermediary Plateau Regions in Enzyme Saturation Curves
Biochem. 8, 4656-4663

VALENTINE, R.C. 1959 The Shape of Protein Molecules Suggested by Electron Microscopy Nature 184, 1838-1841

VALENTINE, R.C. 1968 Regulation of Glutamine Synthetase XII. SHAPIRO, B.M. Electron Microscopy of the Enzyme STADTMAN, E.R. from *E. coli* Biochem. 7, 2143-2152

VILLAR-PALASI, C. 1960 Levels of Activity of the Enzyme of LARNER, J. the Glycogen Cycle in Rat Tissues Arch. Biochem. Biophys. 86, 270-273

WALSH, B. 1973 Diacetyl, Acetoin, and Acetaldehyde Production by Mixed-Species Lactic Starter Cultures App. Microbiol. 26, 820-825

WARBURG, O. 1942 Isolierung und Kristallisierung CHRISTIAN, W. des Gärungsfermentes Enolase Biochem. Z. 310, 384-421

WARD, R.L. 1965 A Magnetic Resonance Study on the SRERE, P.A. Citrate-Lyase of *Streptococcus diacetilactis* Biochem. Biophys. Acta 99, 270-274

WEBER, K. 1969 The Reliability of Molecular Weight OSBORN, M. Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

WHEAT, R.W. 1955a Citritase, the citrate-splitting AJL, S.J. enzyme from *E. coli*. I. Purification and properties J. Biol. Chem. 217, 897-908

WHEAT, R.W. 1955b Citritase, the citrate-splitting AJL, S.J. enzyme from *E. coli*. II. Reaction mechanisms J. Biol. Chem. 217, 909-920

WOOD, H.G. 1975 Isolation of the Subunits of Trans-AHMAD, F. carboxylase and Reconstitution of JAKOBSON, B. the Active Enzyme from the Subunits CHUANG, M. J. Biol. Chem. 250, 918-926 BRATTIN, W.

YPANTIS, D.A. 1964 Equilibrium Ultracentrifugation of Dilute Solutions Biochem. 3, 297-317

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk, danke ich für die Anregungen zu dieser Arbeit, für sein Interesse an ihrem Fortgang und für die mir stets gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. F. Mayer möchte ich für die umfassende elektronenmikroskopische Untersuchung der Citrat-Lyase und seine freundliche Hilfsbereitschaft meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Frau Dr. E.-M. Gottschalk gilt mein Dank für die Durchführung der Experimente mit der analytischen Ultrazentrifuge. Herrn Dr. N. Beuscher danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei den elektrophoretischen Untersuchungen und Fräulein G. Behrens bei der Durchführung der Anreicherung. Herrn Dr. J. Wiegel danke ich für die anregende Diskussion über enzymkinetische Probleme.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, die mir das Studium ermöglichten.

LEBENSLAUF

Am 28. Februar 1950 wurde ich als älteste von drei Töchtern des Bauingenieurs und Baumeisters Horst Kümmel und seiner Frau, der Kindergärtnerin Christa Kümmel,geb. Kleingärtner, in Göttingen geboren.Im Dezember 1954 siedelten meine Eltern nach Duisburg über.Im März 1956 wurde ich eingeschult und besuchte bis März 1960 die Grundschule (Gustav-Adolf-Schule) in Duisburg-Neudorf.
Nach bestandener Aufnahmeprüfung besuchte ich ab April 1960 bis Oktober 1961 das neusprachliche Mädchengymnasium (Johanna-Sebus-Schule) in Duisburg.Im August 1961 zogen meine Eltern nach Moers, und ich besuchte ab November 1961 das Städtische Mädchengymnasium (neusprachlicher Zweig) in Moers. Am 27. Mai 1968 legte ich die Reifeprüfung ab.
Am 10. Oktober 1968 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität Göttingen für das Studienfach Mikrobiologie.
Im Oktober 1970 legte ich das Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie,Physik,Chemie und Botanik in Göttingen ab.Von Mai bis Juli 1971 absolvierte ich ein Praktikum bei Dr. N. Walker in Rothamsted Experimental Station Harpenden,England.
Im Oktober 1972 legte ich die mündliche Diplom-Hauptprüfung für Biologie ab mit Mikrobiologie als Hauptfach und Biochemie und Organischer Chemie als Nebenfächer.Im Juli 1973 beendete ich meine Diplomarbeit mit dem Titel: "Anreicherung und Eigenschaften der Citrat-Lyase von Milchsäurebakterien".
Im Oktober 1973 begann ich mit der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation.